

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

FUNCIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN Notch  
EN EL DESARROLLO DEL SISTEMA  
HEMATOPOYÉTICO.

TESIS DOCTORAL

PEDRO MELGAR ROJAS  
MADRID, 2009



El trabajo presentado en esta tesis doctoral ha sido realizado en el Departamento de Inmunología y Oncología del Centro Nacional de Biotecnología (CSIC) bajo la dirección del Dr. José Luis de la Pompa, la tutoría de la Dra. Sonsoles Campuzano y en colaboración con el grupo del Dr. Miguel Ángel Rodríguez Marcos y la Dra. M<sup>a</sup> Luisa Gaspar.

Esta tesis ha sido posible gracias a una beca de Formación de Profesorado Universitario del Ministerio de Educación y Ciencia.





Con MariCarmen, a nuestros padres:  
Miguel y M<sup>a</sup> Carmen, Anselmo y Victoria.



Cómo del óvulo ese se hace una persona: con su cabeza en su sitio, con sus manos en su sitio y con todo lo demás. Eso... eso es el misterio más grande que hay.

*—Màrgara Carbonell—*



AGRADECIMIENTOS



El trabajo de esta tesis doctoral no hubiera sido posible sin la colaboración de un gran número de personas que, muchas veces desde lo oculto, han contribuido a hacerla realidad.

Gracias, en primer lugar, a José Luis por haberme brindado la oportunidad de trabajar en su grupo, por su paciencia y por todo lo que he aprendido con él lo largo de estos años. Gracias a Miguel Ángel y a M<sup>a</sup> Luisa, en su ayuda inestimable con el proyecto de hematopoyesis; a Maribel, por trabajar “codo con codo” conmigo.

Cómo no mencionar a mis compañeros de grupo, aunque muchos ya nos han ido dejando: Alejandro, Eduardo, Quim, Miriam, Gonzalo, Álvaro, Eva, Luis, Patricia, Ana, Donal, Meritxell, Guille y Belén gracias a todos por vuestro apoyo y ayuda. A los componentes del grupo de Miguel Ángel y M<sup>a</sup> Luisa que me han acogido tan bien durante estos últimos meses de tesis.

Quiero expresar mi agradecimiento, asimismo, a la ayuda inestimable de mis compañeros de piso, que con su amistad y cariño me han hecho superar momentos críticos a lo largo de este trabajo.

A todos, mil gracias.

Finalmente, aunque ocupen el último lugar en este apartado, han sido siempre los primeros: mis padres y hermanos; y sobre todo, gracias a mi joven esposa, la compañera de mi vida. Gracias por su entrega desinteresada, por su apoyo en una infinidad de ocasiones, por serenar y dejar la paz a mi corazón cuando inquieto buscaba un “no-sé-qué” no sé dónde. Ciertamente, estoy en deuda para toda la vida y ¡qué gozo poder estarlo!





# ÍNDICE DE CONTENIDOS



<b>1. ÍNDICE DE CONTENIDOS</b>	<b>1</b>
<b>2. ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS</b>	<b>5</b>
<b>3. ABREVIATURAS</b>	<b>9</b>
<b>4. SUMMARY</b>	<b>13</b>
<b>5. INTRODUCCIÓN</b>	<b>17</b>
• El sistema hematopoyético. Generalidades	17
• Desarrollo embrionario del sistema hematopoyético	20
- Definición de los primeros progenitores hematopoyéticos en el saco vitelino	21
- La hematopoyesis intraembrionaria: el endotelio hemogénico	24
- La colonización de los sitios hematopoyéticos adultos	26
• Control genético de la hematopoyesis embrionaria	26
• La vía de señalización Notch	32
• Notch durante el desarrollo hematopoyético	36
- Patrón de expresión de la vía en los tejidos hematopoyéticos adultos y embrionarios	36
- Función de Notch en la hematopoyesis adulta	36
- Funciones de la vía de señalización Notch en el desarrollo hematopoyético	37
<b>5. OBJETIVOS</b>	<b>41</b>
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>45</b>
• Ratones transgénicos	47
• Disección de los embriones y preparación de suspensiones celulares	48
• Detección de la expresión de EGFP <i>ex vivo</i>	48
• Histología y tinción de Hematoxilina y Eosina (H&E)	48
• Hibridación <i>in situ</i> e inmunohistoquímica $\alpha$ -CD31/PECAM1	49
• Citocentrifugación y tinción de May Grunwald-Giemsa	50
• Citometría de flujo y purificación celular.	50
• Ensayo de formación de colonias hematopoyéticas <i>in Vitro</i> (CFU-C)	51
• Extracción de ARN, síntesis de cDNA y PCR	51
<b>7. RESULTADOS</b>	<b>53</b>
• La activación constitutiva de la vía Notch en los progenitores hematovasculares causa letalidad embrionaria con alteraciones hematopoyéticas	55
• Los embriones Tie2-CRE/+;N1ICD/+ presentan mosaicismo para los linajes derivados de progenitores Tie2 <sup>+</sup>	59
• La expresión de N1ICD en progenitores Tie2 <sup>+</sup> resulta en una sobre-activación generalizada de la vía y una ausencia de hematopoyesis intraembrionaria.	62
• Activación constitutiva de Notch: Frecuencias de progenitores multipotenciales y HSCs embrionarias	63
• Alteraciones funcionales de progenitores hematopoyéticos N1ICD+	66
• Bloqueo parcial de la diferenciación eritroide en los embriones Tie2-CRE/+;N1ICD/+	67

• Notch y la mielopoyesis embrionaria . . . . .	69
• Notch proliferación y apoptosis en la hematopoyesis embrionaria. . . . .	71
• Notch y la regulación genética regulador de la hematopoyesis embrionaria . . . . .	73
- La regulación genética en la emergencia de la hematopoyesis . . . . .	73
- La regulación genética de la eritropoyesis y Notch . . . . .	75
- La regulación genética de desarrollo mieloide y Notch . . . . .	76
- Las interacciones Notch-Wnt en hematopoyesis . . . . .	77
 <b>8. DISCUSIÓN . . . . .</b>	 <b>79</b>
• La función de Notch es esencial para el desarrollo embrionario del sistema Hematopoyético . . . . .	81
• La sobre-expresión de N1ICD en los progenitores Tie2+ conduce a una reducción severa de la hematopoyesis intraembrionaria . . . . .	82
• La sobreactivación de Notch en progenitores hematovasculares tempranos mantiene en el tiempo la población de hemangioblastos embrionarios . . . . .	84
• Activación constitutiva de Notch: promoción inicial y bloqueo posterior de la maduración eritroide y mieloide . . . . .	85
- Notch y la maduración eritroide . . . . .	85
- Notch y la diferenciación mieloide . . . . .	85
• La sobreactivación de la vía Notch conduce a un incremento en la tasa de proliferación y una disminución de la apoptosis . . . . .	86
• Los embriones Tie2-CRE/+;N1ICD/+ presentan una alteración selectiva de la expresión de algunos factores de transcripción claves durante la hematopoyesis embrionaria . . . . .	87
• Reflexiones finales . . . . .	88
 <b>9. CONCLUSIONES . . . . .</b>	 <b>89</b>
 <b>10. BIBLIOGRAFÍA . . . . .</b>	 <b>93</b>

# ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS



<b>Figura 1.</b> Diferenciación de los linajes hematopoyéticos en el ratón . . . .	17
<b>Figura 2.</b> Los islotes sanguíneos durante el desarrollo embrionario . . . .	21
<b>Figura 3.</b> Desarrollo del sistema hematopoyético . . . . .	23
<b>Figura 4.</b> Estructura de la región de la AGM en el embrión de ratón . . . .	25
<b>Tabla 1.</b> Fenotipo hematopoyético y vascular de los embriones mutantes en genes esenciales para el desarrollo hematovascular temprano. . . . .	28
<b>Figura 5.</b> Representación esquemática de receptores y ligandos de la vía de señalización Notch . . . . .	32
<b>Figura 6.</b> La vía de señalización Notch . . . . .	34
<b>Figura 7.</b> Mecanismos de acción clásicos de la vía de señalización Notch. . . .	35
<b>Tabla 2.</b> Fenotipo hematopoyético de los embriones mutantes para algunos genes de la vía de señalización Notch . . . . .	39
<b>Figura 8.</b> El ratón transgénico Rosa26-N1ICD/EGFP . . . . .	47
<b>Tabla 3.</b> Primers y condiciones usados en los análisis de RT-PCR . . . . .	52
<b>Figura 9.</b> Fenotipo de los embriones transgénicos Tie2-CRE/+; N1ICD/+ . . . .	56
<b>Figura 10.</b> Análisis histológico del saco vitelino de los embriones Tie2-CRE/+; N1ICD/+ . . . . .	57
<b>Figura 11.</b> Estudio histológico de las grandes arterias intraembrionarias en embriones Tie2-CRE/+; N1ICD/+. . . . .	58
<b>Figura 12.</b> Evolución de la expresión de la EGFP en los embriones Tie2-CRE/+;N1ICD/+ . . . . .	60
<b>Figura 13.</b> Expresión de EGFP en la vasculatura del saco vitelino y del embrión . . . .	61
<b>Figura 14.</b> Expresión de los componentes de la vía de señalización Notch en el saco vitelino embrionario . . . . .	62
<b>Figura 15.</b> La hematopoyesis definitiva está completamente bloqueada en los embriones Tie2-CRE/+;N1ICD/+ . . . . .	63
<b>Figura 16.</b> Efecto de la sobre-activación de la vía Notch sobre el desarrollo mieloide temprano . . . . .	64
<b>Figura 17.</b> La población de progenitores hematopoyéticos inmaduros se encuentra expandida en el compartimento EGFP <sup>+</sup> del saco vitelino . . . . .	65
<b>Figura 18.</b> La sobre-expresión de N1ICD en progenitores Tie2 <sup>+</sup> conduce a una alteración funcional de los progenitores hematopoyéticos . . . . .	67

<b>Figura 19.</b> <i>Notch y el desarrollo eritroide temprano</i>	68
<b>Figura 20.</b> <i>La población de megacariocitos se encuentra preservada en el saco vitelino de los embriones transgénicos</i>	69
<b>Figura 21.</b> <i>Efecto de la sobreactivación de la vía Notch sobre la diferenciación mieloide</i>	70
<b>Figura 22.</b> <i>La activación constitutiva de Notch conlleva un incremento en la tasa de proliferación celular</i>	72
<b>Figura 23.</b> <i>Notch disminuye el porcentaje de células en apoptosis.</i>	73
<b>Figura 24.</b> <i>Análisis genético de la expresión de genes esenciales de la hematopoyesis embrionaria</i>	74
<b>Figura 25.</b> <i>Expresión de SCL, Fli1 y GATA2 en los progenitores cKit<sup>+</sup></i>	75
<b>Figura 26.</b> <i>Estudio de la expresión génica de genes de linaje eritroide, mieloide y de la vía Wnt en los embriones transgénicos</i>	76
<b>Figura 27.</b> <i>Modelo de activación de Notch en el desarrollo hematopoyético</i>	83



# ABREVIATURAS



**7AAD:** 7-Actinomicina D.

**32D:** Línea murina de células progenitoras mieloides.

**AGM:** *Aorta-Gonads-Mesonephros*.

**APC:** Alofococinina.

**BFU-E:** *Burst-Forming Unit-Erythroid*.

**Bio:** Biotina.

**BL-CFCs:** *Blast Colony-Forming Cells*.

**BMP:** *Bone Morphogenetic Protein*.

**BrdU:** Bromodeoxiuridina.

**BSA:** *Bovine serum albumine*.

**CD45:** Antígeno leucocitario común.

**CD71:** Receptor de transferrina.

**CD117/cKit:** Marcador de progenitores hematopoyéticos inmaduros.

**Células ES:** *Embryonic Stem cells*.

**CFU:** *Colony-Forming Unit*.

**CFU-C:** *Colony-Forming Unit-Culture*.

**CFU-E:** *Colony-Forming Unit-Erythroid*.

**CFU-S:** *Colony-Forming Unit-Spleen*.

**CLP:** *Common Lymphoid Progenitor*.

**CMP:** *Common Myeloid Progenitor*.

**CSL:** *CBF1, Suppressor of hairless y Lag1 en H. sapiens, D. melanogaster y C. elegans* respectivamente.

**DAB:** Diaminiobenzidina.

**ddH<sub>2</sub>O:** Agua destilada.

**DMSO:** *Dimetil Sulfóxido*.

**DSL:** *Delta, Serrate y Lag2 en D. melanogaster, X. laevis y D. rerio*.

**EGF:** *Epidermal-Growth Factor*.

**EGFP:** *Enhanced Green Fluorescent Protein*.

**EPO:** Eritropoyetina.

**EtOH:** Etanol.

**FACS:** *Fluorescence-Activated Cell Sorting*.

**FBS:** *Fetal Bovine Serum*.

**GMP:** *Granulocyte-Monocyte common Progenitor*.

**GOF:** Modelos experimentales de ganancia de función.

**HCl:** Ácido clorhídrico.

**HES:** *Hairy/Enhancer of Split*.

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** Peróxido de Hidrógeno.

**HPP-CFC:** *High Proliferative Potencial Colony- Forming Cell*.

**HSC:** *Hematopoietic Stem Cell*.

**IL:** InterLeukina.

**IPT:** *Immunoglobulin-like fold, Plexins and Transcription factors*.

**K562:** Línea celular de eritroleucemia humana.

**LOF:** Modelos experimentales de pérdida de función.

**LT-HSC:** *Long-Term repopulating Hematopoietic Stem Cell*.

**MEP:** *Myeloid-Erythroid common Progenitor*.

**MetOH:** Metanol.

**NECD:** *Notch Extracellular Domain*.

**NICD:** *Notch Intracellular Domain*.

**NLS:** *Nuclear Location Signal*.

**PBS:** Tampón fosfato salino.

**PCR:** *Polymerase Chain Reaction*.

**PE:** Ficoeritrina.

**PEST:** Secuencia formada por los aminoácidos: Prolina, glutamato (E), Serina y Treonina.

**PFA:** *Paraformaldehído*.

**P-Sp:** *Para-aortic Splanchnopleure*.

**RPBJK:** *Recombination signal sequence-Binding Protein J-K*.

**RT-PCR:** *Retro Transcriptase Polymerase Chain Reaction*.

**SCF:** *Stem Cell Factor*.

**ST-HSC:** *Short-Term repopulating Hematopoietic Stem Cells*.

**Strep:** Estreptavidina.

**Strep-PE:** Estreptavidina acoplada a ficoeritrina.

**TACE:** *Tumour necrosis factor-alpha-converting-enzyme*.

**TAN1:** *human Truncated Activated Notch1*.

**T-ALL:** *T-Acute Lymphoblastic Leukemia*.

**VEGF:** *Vascular Endothelial Growth Factor*.

**vWf:** Factor de Von Willebrand.

**WT:** *Wild Type* (referido a células, embriones, animales adultos, etc., con un genotipo y fenotipo normal).

SUMMARY



Notch is a local signaling pathway that regulates embryonic cell fate determination, differentiation, and patterning. Vertebrate Notch genes encode an evolutionarily conserved group of type I transmembrane protein receptors. The extracellular region of Notch can interact with membrane-bound ligands of the Delta or Serrate/Jagged families in mammals. This interaction is followed by two sequential proteolytic events that result in the generation and nuclear translocation of the Notch intracellular domain (NICD). In the nucleus, the NICD heterodimerizes with the transcriptional repressor CSL –RBPJK in mammals- and converts it into a transcriptional activator. Main NICD/RBPJK target genes include those encoding basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factors of the HES and Hey/HRT/Herp families.

For more than a century, many investigators have worked to understand the genetic regulation of the hematopoietic development. In the last two decades, several groups have reported essential functions of Notch in definitive hematopoiesis and also in binary cell choices along lymphohematopoietic differentiation, specially in T cells. This way, 50% of T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia (T-ALL) patients carry translocations and/or mutations that result in the constitutive activation of Notch1. These data suggest that Notch function is essential for the correct functioning of the hematopoietic system.

We have examined the effect of overexpression of N1ICD on embryonic Tie2<sup>+</sup> cells and their progeny during embryonic development. In the postgastrulation mouse embryo, *Tie2* is expressed in both endothelial and hematopoietic progenitors. Embryonic day (E) 9 to 10 transgenic embryos (Tie2-CRE/+;N1ICD/+) showed dramatic reduction of embryo-derived hematopoiesis and hematopoietic changes in the yolk sac: marked depletion of multipotent progenitors, early partial blockade in erythroid cell differentiation and hemoglobinization, and promotion of the first stages of myelopoiesis, but repression of final maturation where the generation of granulocytes is selectively inhibited. In addition, the embryonic bipotential progenitor population that usually disappears at E7.5-8, persists until E9.5-10 as an autonomous effect of the overexpression of N1ICD. The intraembryonic definitive hematopoiesis is almost completely abolished. Hierarchical genetic analysis of N1ICD<sup>+</sup> vs. WT cell populations revealed that Notch regulates the transcriptional activity of genes that are essential for the onset, commitment and differentiation of hematopoietic lineages. Taken together with defects in heart development, results in a lethal phenotype between E10-10.5.

In summary, our data show that Notch is essential during the first stages of embryonic hematopoietic development may be by acting together with other signalling pathways to regulate the gene expression of target key genes during the embryonic hematopoiesis.





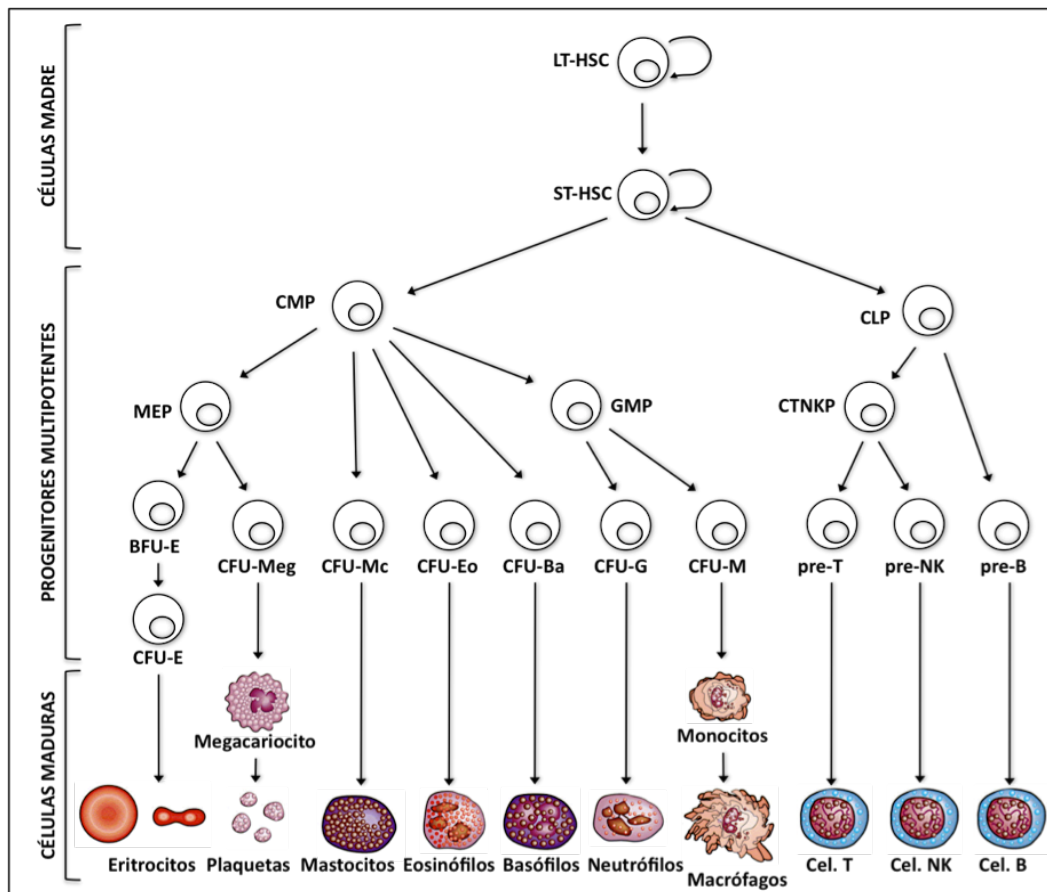
# INTRODUCCIÓN



## El Sistema Hematopoyético. Generalidades.

La hematopoyesis o hemopoyesis (del griego  $\alpha\tilde{\iota}\mu\alpha$  -ατος-, "sangre" y  $\pi\acute{o}\iota\eta\sigma\iota\varsigma$ , "creación") es el proceso por el cual se generan, desarrollan y maduran todos los linajes celulares que forman la sangre y el sistema inmunológico del organismo, a partir de un precursor común indiferenciado conocido como célula madre hematopoyética (HSC). De esta manera, el sistema hematopoyético es aquel formado por todos estos linajes celulares. Los órganos hematopoyéticos en el adulto son: la médula ósea, donde residen las HSCs, el bazo, el timo, los ganglios linfáticos, las placas de Peyer, los llamados GALT (*Gut-associated-lymphoid tissue*), entre otros.

En el sistema hematopoyético se reconocen diversos compartimentos celulares, que podemos agrupar en: *células madre* (LT-HSCs, ST-HSCs), *progenitores multipotenciales*, *progenitores oligolinaje*, *precursores restringidos a linaje celular* y *células maduras* (Figura 1). Desde de las HSCs hasta los linajes más diferenciados, existe un proceso de diferenciación celular que conlleva la generación y especificación de precursores cada vez más comprometidos hacia un linaje concreto y con una pluripotencialidad menor.



**Figura 1.** Diferenciación de los linajes hematopoyéticos en el ratón. En la visión clásica de la maduración hematopoyética, las células madre hematopoyéticas (LT-HSC) son la fuente de todos los linajes sanguíneos del organismo. A partir de las LT-HSC, se generan las HSC con capacidad de reconstituir el sistema hematopoyético de ratones irradiados letalmente a corto plazo (ST-HSCs). De ella, se diversifican dos grandes ramas: el linaje mieloide, a partir del progenitor mieloide común (CMP), y el linfóide, del progenitor linfóide común (CLP). El CMP dará lugar al progenitor común de eritrocitos y megacariocitos (MEP) y los progenitores de granulocitos (eosinófilos, basófilos y neutrófilos), mastocitos y monocitos/macrófagos; mientras que del CLP se generan las células NK y los linfocitos B y T (adaptado de Reyes et al, 2001).

Las HSCs son las responsables de la generación continua y de por vida de todas las demás células hematopoyéticas debido a la corta vida media de estas últimas. Las características principales y exclusivas de las HSCs son: (1) poseen la *máxima capacidad de autorrenovación y diferenciación*; (2) son las únicas capaces de *reconstituir en su totalidad el sistema hematopoyético* de animales irradiados letalmente, y además, (3) este potencial es *a largo plazo* por lo que se las conoce como *Long-Term repopulating HSCs (LT-HSC)*.

Dentro de la población de LT-HSCs, se han descrito dos tipos de divisiones celulares. Por un lado, divisiones *simétricas* que conllevan a la generación de dos células idénticas a la LT-HSC de origen, expandiendo así un *pool* de progenitores indiferenciados en la médula ósea. En segundo lugar, divisiones *asimétricas*, mediante las cuales se generan dos células diferentes: la primera permanece como LT-HSC, mientras que la segunda inicia el camino de especificación y diferenciación hacia uno de los linajes hematopoyéticos (Figura 1).

Los estadios intermedios de diferenciación entre las LT-HSCs y las células maduras están constituidos por células que han sufrido restricciones en la capacidad de diferenciación, pero todavía no han adquirido los cambios morfológicos típicos de las células maduras. Son los **progenitores multipotenciales** (Figura 1), cuya característica propia es que han perdido ya el potencial de autorrenovación. A estos progenitores multipotenciales se les conoce también como la *transit-amplifying cell population*. Las capacidades de proliferación y maduración de los diferentes tipos de células hematopoyéticas se pueden estudiar mediante *ensayos funcionales* o **CFU-C** (*colony-forming unit culture*). Estos ensayos funcionales parten de una población hematopoyética que es sometida a unas condiciones en las que se pueden determinar tanto el potencial de diferenciación (linajes hematopoyéticos generados), como el potencial de proliferación (número total de células hijas producidas). Mediante CFU-C se puede cuantificar la frecuencia de progenitores en una población determinada. Estos progenitores multipotenciales comprometidos con un linaje concreto y capaces de dar lugar a colonias *in vitro*, clásicamente han recibido el nombre genérico de *unidades formadoras de colonias (CFU)*<sup>1</sup>.

Al final de la diferenciación, se encuentran las poblaciones de **células maduras** de los diferentes linajes, que suponen el último estadio del proceso de maduración y constituyen las células funcionales/efectoras del sistema hematopoyético.

El sistema hematopoyético es crítico para la supervivencia del organismo. Entre sus funciones, las más destacadas son: el aporte de oxígeno y nutrientes a todas las células del organismo y la defensa ante agresiones producidas desde el exterior y/o por patógenos. Enfermedades humanas como la talasemia, las inmunodeficiencias y las leucemias representan alteraciones graves de la función normal del sistema hematopoyético que pueden conducir a la muerte del individuo.

## El desarrollo hematopoyético.

El hematopoyético es el primer sistema funcional durante la embriogénesis que ha

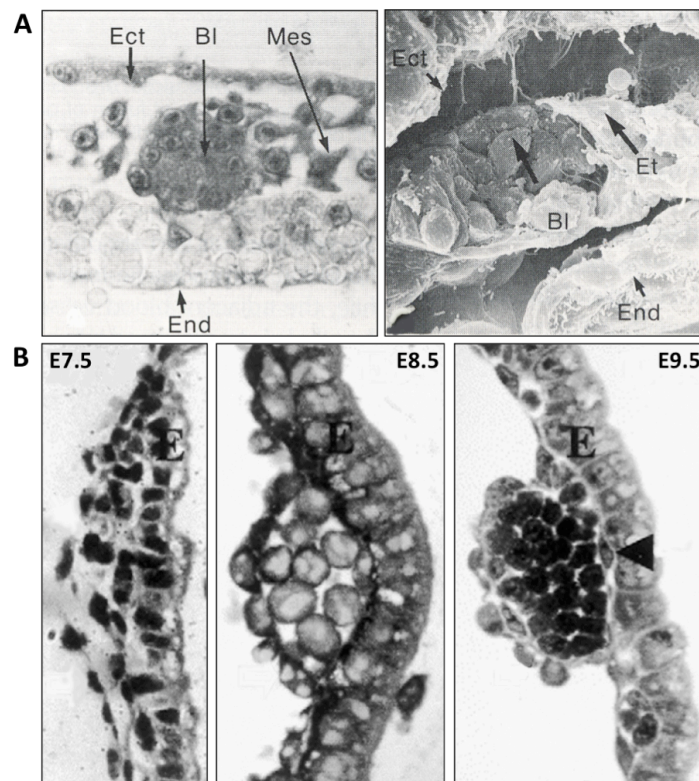
---

<sup>1</sup> El primer ensayo desarrollado para cuantificar la capacidad de proliferación y de diferenciación de células hematopoyéticas detectó una subpoblación de progenitores que, 11-12 días después de ser trasplantadas a ratones irradiados letalmente, eran capaces de originar colonias de células hematopoyéticas en el bazo de los animales transferidos; y además, si se aislaban y se trasplantaban de nuevo, algunas eran capaces de generar nuevas colonias esplénicas en los receptores secundarios. Por este motivo, estas células recibieron el nombre de **CFU-S** (*colony forming unit-spleen*), de manera que las CFU-S definen una célula capaz de autorrenovarse y de diferenciarse en distintos linajes hematopoyéticos, características ambas de una célula pluripotente.

evolucionado para asegurar una protección y aporte correcto de oxígeno y nutrientes a todas la células del organismo. Su desarrollo implica la especificación de diferentes poblaciones celulares que siguen un patrón de localización espacial muy dinámico. Este proceso comienza al principio de la gastrulación (día de gestación (E) 7.0 en ratón) y continúa durante toda la vida del individuo (revisado en Orkin & Zon, 2008).

#### Definición de los primeros progenitores hematopoyéticos en el saco vitelino.

Los primeros progenitores bipotenciales (hemangioblastos, ver más adelante) capaces de dar lugar a células vasculares y precursores hematopoyéticos, se localiza en el mesodermo caudal de la línea primitiva a E7.0 (Huber et al, 2004). Sin embargo, la primera evidencia visible de células sanguíneas en el embrión reside en el saco vitelino extraembrionario a E7.5, en las estructuras conocidas como los *islotes sanguíneos*, que generan la primera población eritrocitos. Los islotes sanguíneos son agregados celulares *policlonales* (Ueno & Weissman, 2006) que en el embrión de ratón se localizan en el espesor comprendido entre el ectodermo y el endodermo visceral (Figura 2A, 3B). Estos *clusters* de células están compuestos por dos poblaciones: una más interna de células hematopoyéticas, que acumulan hemoglobina, y otra que recubre a las anteriores formada por células aplanadas que darán lugar a endotelio (Figura 2B, 3B; revisado en Ferkowicz & Yoder, 2005).



**Figura 2.** Los islotes sanguíneos durante el desarrollo embrionario. **A.** Imágenes de microscopía óptica convencional (panel de la izquierda) y de microscopía electrónica de barrido (panel de la derecha) de una sección del saco vitelino de un embrión de pollo en la que se aprecia un islote sanguíneo (BI), entre el ectodermo (Ect) y el endodermo (End) visceral. Mes: células de mesodermo. Tomado de Ballinsky, 1991. **B.** Morfología de un islote sanguíneo desde su comienzo (E7.5) hasta la formación de un vaso sanguíneo maduro (E9.5). E: endodermo visceral. Modificado de (Palis & Yoder, 2001).

En los islotes sanguíneos se genera por un lado, la primera población de eritrocitos clásicamente denominados “primitivos”, caracterizados por ser nucleados y expresar exclusivamente hemoglobinas fetales (Russell, 1979); y en segundo lugar, parte de la vasculatura del saco vitelino. El resto de la vasculatura embrionaria deriva de angioblastos: células mesodérmicas generadas también en la región posterior de la línea primitiva que dan lugar exclusivamente al linaje endotelial (Kinder et al, 1999).

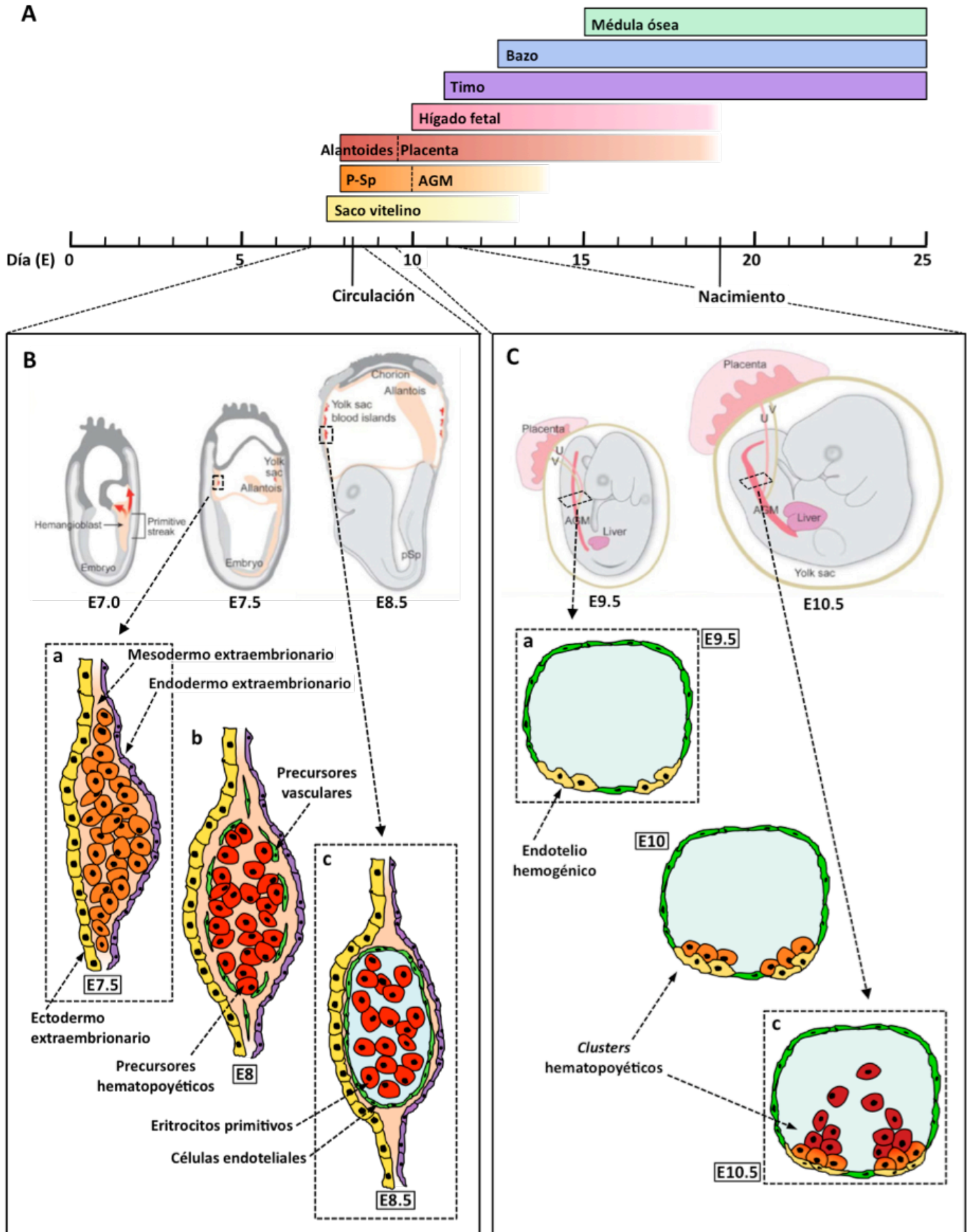
Existe, por tanto, una estrecha asociación entre estas primeras células hematopoyéticas del saco vitelino y los precursores endoteliales (Risau, 1991; Russell, 1979). Este hecho, llevó al postulado, en las primeras décadas del siglo pasado, de la existencia de un precursor mesodérmico común de ambos linajes, que recibió el nombre de *hemangioblasto* (His, 1900; Sabin, 1917; Murray, 1932). En un principio, se pensaba que cada islote sanguíneo procedía de un hemangioblasto, es decir que estas células seguían un patrón de diversificación clonal. Sin embargo, trabajos recientes sugieren que su origen es policlonal (Ueno & Weissman, 2006).

Gracias al desarrollo de un sistema de diferenciación *in vitro* a partir de células ES de ratón, el grupo del Gordon Keller ha generado la primera evidencia funcional de hemangioblastos en mamíferos: las BL-CFCs (*Blast Colony-Forming Cells*). Estas células poseen dos características: la bipotencialidad o capacidad de producir colonias de tipo “blasto” *in vitro* con un componente vascular y otro hematopoyético (Choi et al, 1998); y la expresión de marcadores típicos de células mesodérmicas y hematovasculares: *Brachyury* (*Bry/T*; Huber et al, 2004) y *Fetal liver kinase 1* (*Flk/KDR*; Kabrun et al, 1997). Por este motivo, es actualmente aceptado que las BL-CFCs corresponden al análogo *in vitro* de los hemangioblastos embrionarios.

Durante la última década, trabajos del grupo de G. Keller han determinado que células que expresan *Bry* y *Flk1*, presumiblemente los hemangioblastos bipotenciales, aparecen ciertamente en la región posterior de la línea primitiva (Huber et al, 2004). El hemangioblasto representa un estadio transitorio *in vivo*, de manera que desde la línea primitiva migra hacia el saco vitelino extraembrionario y el alantoides (Lawson et al, 1991). En el saco vitelino, estas células adquieren los destinos endotelial y hematopoyético antes de la formación de los *islotes sanguíneos*.

---

**Figura.3.** *Desarrollo del sistema hematopoyético.* **A.** Escala temporal del desarrollo embrionario del ratón en el que se muestran los días de gestación, el comienzo de la circulación entre el embrión y el saco vitelino (E8.25-8.5) y el momento del nacimiento (entorno a E19). En la parte superior queda ilustrada la duración de la hematopoyesis en cada tejido embrionario. **B.** Representación esquemática del comienzo de la hematopoyesis en el saco vitelino. En la parte superior, están dibujados tres embriones de ratón en diferentes estadios del desarrollo (adaptados de Dzierzak & Speck, 2008) en los que se muestra la localización de los islotes sanguíneos (recuadros en E7.5 y E8.5). La parte inferior corresponde al desarrollo de un islote sanguíneo a partir de una condensación de células del mesodermo extraembrionario entre el endodermo y ectodermo visceral (a) de las que derivan los precursores hematopoyéticos (en rojo) y vasculares (en verde, b) que formarán el endotelio de los vasos sanguíneos del saco vitelino y los eritrocitos nucleados primitivos (c). **C.** Inicio de la hematopoyesis intraembrionaria en la región de la P-Sp/AGM. Los dibujos de la parte superior muestran un embrión de ratón a E9.5 y E10.5 (adaptados de Dzierzak & Speck, 2008). Durante estos estadios de desarrollo, algunas células de la pared ventral de la aorta muestran/adquieren un potencial hemogénico (a, en amarillo) de manera que son capaces de generar progenitores hematopoyéticos (b, en naranja) que formarán *clusters* adheridos al endotelio ventral de esta arteria (c) desde los cuales estos precursores (en rojo) van siendo liberados al torrente circulatorio. a-c representan cortes transversales de la aorta dorsal en la región de la AGM. Dorsal, arriba y ventral, abajo.



Poco después, a **E7.5**, aparecen progenitores eritromieloides en el saco vitelino, mientras que los progenitores multipotenciales no son detectados hasta **E8.5**, cuando ya se ha establecido la circulación embrionaria (Cumano et al, 1996; Godin et al, 1995). En este estadio, las células derivadas del saco vitelino poseen una capacidad funcional limitada: no existen CFU-S (*colony forming units-spleen*), ni tampoco LT-HSCs. Los primeros aparecen a **E9**, mientras que las segundas a **E11** (Medvinsky & Dzierzak, 1996; Medvinsky et al, 1993; Muller et al, 1994). Por tanto, la aparición temporal de progenitores diferenciados y las células madre en el saco vitelino es en orden inverso al descrito anteriormente para hematopoyesis de la médula ósea adulta (Figura. 1).

#### La hematopoyesis intraembrionaria: el endotelio *hemogénico*.

Los primeros estudios sobre la ontogenia hematopoyética durante el desarrollo embrionario se focalizaron en el saco vitelino como la única fuente de células hematopoyéticas y el origen de este sistema en el adulto, en embriones de pollo (Moore & Owen, 1965; Moore & Owen, 1967) y de ratón (Moore & Metcalf, 1970), lo que recibió el nombre de *teoría hematógena*. Sin embargo, poco después, experimentos de trasplantes entre embriones de pollo y codorniz (Dieterlen-Lievre, 1975; Dieterlen-Lievre & Martin, 1981) y estudios con embriones de anfibios (Kau & Turpen, 1983; Maeno et al, 1985; Turpen et al, 1981), revelaron por primera vez un área de potente actividad hematopoyética en las regiones intraembrionarias que rodeaban a la aorta dorsal y al pronefros, que comenzaría antes de establecerse la circulación entre el embrión y el saco vitelino. Estos trabajos, por tanto, permitieron demostrar claramente que el origen del sistema hematopoyético adulto era intraembrionario, con lo que esta actividad recibió el nombre de *hematopoyesis definitiva*.

Posteriormente, el descubrimiento de la región de la esplacnopleura para-aórtica (P-Sp), que más adelante se diferenciará en la llamada Aorta-Gónada-Mesonefros (AGM) como un sitio esencial de hematopoyesis definitiva en los embriones de ratón (Cumano et al, 1996; Godin et al, 1993; Medvinsky et al, 1993; Muller et al, 1994); y humano (García-Porrero et al, 1995; Taviani et al, 1996) mostró la conservación evolutiva de este fenómeno y sugirió un enorme paralelismo con la ontogenia hematopoyética de los vertebrados no mamíferos (Figura 3C; revisado en Jaffredo et al, 2005b).

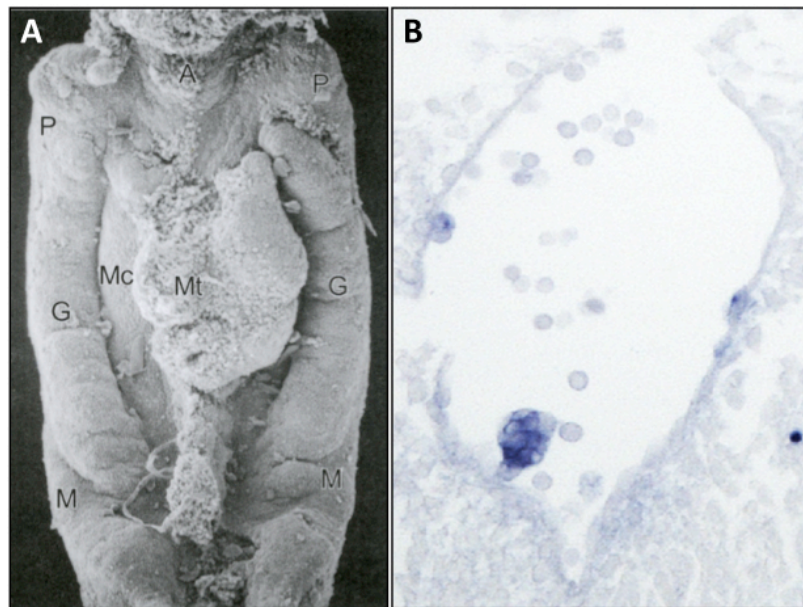
La P-Sp comprende la región intraembrionaria del mesodermo esplácnico con capacidad hematopoyética entre **E7-9**. En esta región a estos estadios se desarrollan las aortas dorsales bilaterales y la arteria onfalomesentérica o vitelina. A partir de **E9**, la aorta dorsal se ha fusionado en la línea media del embrión y se han formado adyacentes a ella algunos componentes del sistema urogenital que son ya morfológicamente distinguibles (Figura 4A). Es entonces cuando esta región recibe el nombre de AGM (Medvinsky et al, 1993; Muller et al, 1994) que entre **E10-E12** aumenta de tamaño.

La actividad hematopoyética más temprana detectada en la región de la P-Sp es a **E8.5**, que produce progenitores multipotenciales de linaje eritroide, mieloide, y linfoide (Godin et al, 1995). A **E9**, se detectan CFU-S definitivas en la región de la P-Sp/AGM (Medvinsky et al, 1993), progenitores (*colony-forming cells*) con un alto potencial proliferativo (HPP-CFC) y células con capacidad de reconstituir el sistema hematopoyético completo de neonatos (Yoder et al, 1997a; Yoder et al, 1997b). Finalmente, las primeras LT-HSC, aparecen en la región del AGM a **E10**, unas 24h antes que en el YS (Cumano et al, 1996; Medvinsky & Dzierzak, 1996; Muller et al, 1994).

Las LT-HSCs de la AGM se generan por un proceso ligeramente diferente a los progenitores eritroides primitivos (Figura 3C): un grupo discreto de células endoteliales de la pared ventral de



la aorta dorsal y las arterias vitelinas y umbilicales, muestran un potencial hemogénico (Jaffredo et al, 1998). De esta manera, se forman *clusters* de células hematopoyéticas que protuyen de la pared endotelial y van liberando células al torrente circulatorio (Figura 3C, 4B; revisado en Jaffredo et al, 2005a). Poco después, las LT-HSCs se localizan también en otros tejidos: la placenta, el saco vitelino y el hígado fetal (Gekas et al, 2005; Medvinsky & Dzierzak, 1996; Muller et al, 1994; Ottersbach & Dzierzak, 2005). De hecho, la aparición de estos clusters hematopoyéticos asociados a la aorta dorsal fueron ya descritos a principios del siglo pasado en embriones de conejo, de rata, de cerdo, de pollo y humanos (Maximow, 1909; Minot, 1912; Emmel, 1916; Jordan, 1916; Miller, 1913).



**Figura 4.** Estructura de la región de la AGM en el embrión de ratón. **A.** Visión ventral de la región de la AGM disecada de un embrión de ratón de E11, donde se aprecian las estructuras del sistema urogenital. La aorta dorsal (A) que se localiza medialmente por debajo del mesenterio (Mt), está rodeada lateralmente por tejido mesenquimal (Mc). Las estructuras más laterales corresponden al sistema urogenital en desarrollo compuesto por el pronefros (P) y el mesonefros (M) que están cubiertas por las crestas genitales/gónadas (G). Anterior, arriba y posterior, abajo. Tomado de Dzierzak y Oostendorp, 2001. **B.** Hibridación *in situ* de una sección transversal de la aorta dorsal de un embrión de ratón de E10 a la altura de la AGM, en la que se aprecia un *cluster* de células hematopoyéticas que expresan *AML1/Runx1*.

También se han identificado pequeños “parches” en el mesénquima subaórtico que contienen células hematopoyéticas (Bertrand et al, 2005a). Actualmente, se debate si podrían: (1) poseer precursores de las HSCs que se encuentran en los *clusters* hematopoyéticos de la AGM, (2) representar una progenie diferenciada que han penetrado en este tejido desde endotelio hemogénico, o (3) ser una población independiente de la primera (revisado en Dzierzak & Speck, 2008).

La aparición de las células hematopoyéticas del saco vitelino y de la AGM en estadios de desarrollo diferentes (Turpen et al, 1997), hace improbable que ambos linajes compartan un progenitor común, de manera que se generarían de forma independiente. Además, la circulación embrionaria, que rápidamente las distribuiría por todo el embrión, comienza a **E8.25-8.5**, unas 24h después del inicio de la hematopoyesis primitiva.

Finalmente, trabajos de los últimos años han descrito la placenta (Gekas et al, 2005; Ottersbach & Dzierzak, 2005) y el alantoides (revisado en Inman & Downs, 2007) como sitios

adicionales de hematopoyesis. Mientras el alantoides es colonizado por células de otros tejidos, en la placenta, además, se podrían generar progenitores hematopoyéticos *de novo*. La actividad hematopoyética en estas localizaciones abarca el periodo de la hematopoyesis en el AGM y en el hígado fetal (Figura 3A).

#### La colonización de los sitios hematopoyéticos adultos.

Como ya hemos descrito, los primeros estudios sobre la ontogenia hematopoyética condujeron al dogma del saco vitelino como el origen del sistema hematopoyético adulto. De esta manera, se postuló la *teoría de la colonización* según la cual, las HSCs producidas en el saco vitelino colonizaría el hígado fetal y secuencialmente la médula ósea tras el nacimiento (Johnson & Moore, 1975; Moore & Metcalf, 1970). Por su naturaleza migratoria, actualmente está demostrado que células del saco vitelino y de la P-sP/AGM colonizan el hígado fetal. De hecho, los embriones deficientes en el gen de la *integrina*  $\beta 1$  muestran que es necesario para la migración de células hematopoyéticas al hígado fetal (Fassler & Meyer, 1995). El saco vitelino de estos mutantes contiene un número normal de células hematopoyéticas, pero existe una ausencia completa en el hígado. Además, en embriones quiméricos adultos para este gen, se encuentran células no deficientes para la *integrina*  $\beta 1$  en el timo, médula ósea y sangre periférica.

Hoy en día, se acepta que el hígado fetal no genera células hematopoyéticas *de novo*, sino que es colonizado por células exógenas a finales de E9 (28 somitos; Houssaint, 1981; Johnson & Moore, 1975). Sin embargo, la aparición temporal de actividad hematopoyética en el hígado parece estar directamente relacionada con la aparición de estas actividades en la P-sP/AGM y el saco vitelino. Se piensa que al menos dos ondas de células hematopoyéticas colonizan el hígado: a **E9** por eritrocitos primitivos y progenitores eritromieloides, y a **E11** por progenitores hematopoyéticos definitivos y LT-HSCs (Dzierzak & Medvinsky, 1995). El hígado fetal tendría, entonces, la función de expandir las células hematopoyéticas puesto que su número absoluto experimenta enorme incremento entre E9 y E14 (Morrison et al, 1995). Su función hematopoyética comprende desde E9 hasta los primeros días postnatales.

Además del hígado, el rudimento del bazo también es colonizado por células hematopoyéticas a E16 y poco después, la médula ósea se convierte en el órgano hematopoyético predominante y permanente que alberga las LT-HSC y los progenitores del sistema hematopoyético adulto (Delassus & Cumano, 1996; Robb, 1997). Por otro lado, estudios recientes han mostrado la posibilidad de que algunas células hematopoyéticas del adulto provengan directamente del embrión (Gothert et al, 2005) y, más concretamente del saco vitelino (Samokhvalov et al, 2007). Los resultados muestran cómo parte de la progenie de células del saco vitelino marcadas antes del comienzo de la circulación, se encuentran formando parte del endotelio de la aorta dorsal y de los *clusters* hematopoyéticos adheridos a ella. Sin embargo, están actualmente en discusión debido a la aproximación experimental utilizada.

### **Control genético de la hematopoyesis embrionaria.**

Durante muchos años, las diferencias funcionales y celulares entre la eritropoyesis primitiva y definitiva dirigió el interés de los investigadores al estudio del patrón embrionario de expresión de los genes de las globinas (Grosveld et al, 1993). Sin embargo, los avances en las técnicas de manipulación genética en el ratón han permitido el estudio de genes hematopoyéticos importantes en el desarrollo. Algunos de los genes más importantes que regulan la hematopoyesis, están detallados en la Tabla 1. Se trata en su mayoría de factores de

transcripción que modulan el nivel de activación de otros genes, así como el momento en que deben expresarse. Hemos considerado oportuno clasificarlos en tres grupos funcionales, según el fenotipo de los mutantes (Tabla 1) y su papel durante la ontogenia hematopoyética.

#### *Genes de especificación hematopoyética temprana.*

Se trata de genes cuyos mutantes muestran defectos severos en las células del mesodermo, del sistema vascular o hematopoyético del saco vitelino. Son genes de acción temprana involucrados en la señalización celular en los primeros estadios de la especificación hematopoyética a partir del mesodermo, siendo necesarios para la vasculogénesis extraembrionaria y/o para la hematopoyesis embrionaria. Este grupo de genes, podemos subdividirlo en aquellos con un papel primordial en la especificación y desarrollo hacia el linaje endotelial –*Endoglin/CD105*, *KDR/Fkl1*, *Flt1*, *Tie2*–, aquellos otros que actúan sobre la especificación de los primeros precursores hematopoyéticos primitivos –*SCL/Tal1*, *Lmo2/Rbtn2*, *Fli1*–, y por último, un grupo de genes que actúan sobre el mesodermo, afectando, por tanto, tanto al linaje endotelial como al hematopoyético –*BMP4* y *Ldb1*–.

#### *Genes de hematopoyesis definitiva y hepática.*

Estos genes juegan un papel esencial en el punto de divergencia entre el sistema hematopoyético primitivo y definitivo/adulto. Los mutantes para estos genes muestran normalmente el mismo fenotipo: anemia del hígado fetal y letalidad embrionaria entorno a E11-E16. Mientras que el número de CFU-C del YS es normal, están enormemente disminuidos en el hígado. Los progenitores hematopoyéticos definitivos y la población de LT-HSCs están a su vez afectados. Por tanto, se ha involucrado a estos genes en la generación, mantenimiento, potencial proliferativo/clonogénico o autorrenovación de las LT-HSCs. Pertenecen a este grupo: *c-Myb*, *AML1/Runx1*, *GATA2* y *GATA3*.

#### *Genes de diferenciación específicos de linaje.*

Este grupo contiene todos aquellos genes esenciales para activar el programa genético de un linaje hematopoyético concreto, una vez especificadas las células precursoras. La falta de función de estos genes suele cursar con defectos y/o ausencia de las células del linaje concreto en el que actúan. En un primer bloque están todos aquéllos que dirigen las células hacia el linaje eritroide: por un lado, *GATA1* y su *partner* *FOG1*, y en segundo lugar, *KLF1/EKLF* y *KLF2*, *Epo/EpoR*. Mientras los primeros actúan tanto sobre la eritropoyesis primitiva, como la definitiva, los últimos, afectan principalmente a la definitiva. La deficiencia de estos genes resulta en una letalidad embrionaria a E12-16 que cursa con anemia hepática y una ausencia completa de eritropoyesis primitiva y/o definitiva. En el segundo bloque, se encuentran aquellos genes que son requeridos para el compromiso e inicio de la maduración mieloide. El más importante de ellos es el factor de transcripción *PU.1*, que actúa al principio del programa genético activando genes de diferenciación mieloide.

En resumen, los estudios de falta de función y las investigaciones posteriores han demostrado que la regulación molecular de la hematopoyesis durante la ontogenia es muy compleja. Un número creciente de genes están siendo identificados como esenciales para el desarrollo del sistema hematopoyético a todos los niveles. Algunos de ellos solapan en los programas genéticos de la HP primitiva y definitiva, la especificación hematopoyética o incluso en la diferenciación terminal, mientras que otros actúan en un estadio de desarrollo puntual y en un linaje hematopoyético concreto.

**Tabla 1.** Fenotipo hematopoyético y vascular de los embriones deficientes en genes esenciales para el desarrollo hematovascular temprano.

GENES DE ESPECIFICACIÓN HEMATOPOYÉTICA TEMPRANA	GEN	LETALIDAD	FENOTIPO HEMATOPOYÉTICO Y VASCULAR.	REFERENCIAS
	<i>BMP4</i>	E6.5-E9.5	A E7.5-E8.5: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Diferenciación mesodérmica escasa o carente.</li> <li>• Desorganización de las estructuras posteriores del embrión.</li> <li>• Reducción del mesodermo extraembrionario, ausencia de expresión de <i>Brachyury (Bry/T)</i>.</li> <li>• Número reducido de eritrocitos nucleados en los pocos islotes sanguíneos en desarrollo.</li> </ul>	(Winnier et al, 1995)
	<i>Ldb1</i>	E9.5	A E8.5: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Defectos severos en las estructuras extraembrionarias derivadas del mesodermo: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Algunos embriones carecen del alantoides, y cuando existe, está mal desarrollado.</li> <li>- Ausencia de islotes sanguíneos en el saco vitelino.</li> <li>- Defectos en el saco vitelino que no llega a extenderse alrededor de todo el embrión.</li> </ul> </li> </ul>	(Mukhopadhyay et al, 2003)
	<i>Endoglin/CD105</i>	E11.5	A E9.5-10.5: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Retraso de crecimiento: embriones mutantes con 1/3 del tamaño WT.</li> <li>• Acúmulos de células rojas en puntos discretos del saco vitelino.</li> <li>• Ausencia de vasos sanguíneos organizados y defectos en el remodelado vascular.</li> <li>• Defectos en el desarrollo de las células de músculo liso vascular, previo a la alteración endotelial.</li> </ul>	(Li et al, 1999)
	<i>Flk1/KDR</i>	E8.5-E9.5	A E8.5-E9: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ausencia completa de endotelio vascular: aorta dorsal, arteria vitelina y endocardio.</li> <li>• No se forman islotes sanguíneos en el saco vitelino, con lo que no se desarrollan vasos ni células hematopoyéticas en este tejido.</li> </ul>	(Shalaby et al, 1995)
	<i>Flt1/VEGFR1</i>	E8.5-E9	A E8.5: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Vasculatura embrionaria desorganizada: se encuentran células endoteliales en el lumen de los vasos y en la cavidad ventricular del corazón.</li> <li>• Desarrollo anormal de los islotes sanguíneos: numerosos angioblastos se encuentran mezclados con las células hematopoyéticas del interior de los islotes.</li> </ul>	(Fong et al, 1995)

GENES DE ESPECIFICACIÓN HEMATOPOYÉTICA TEMPRANA	<i>Tie2/Tek</i>	E9.5-E10.5	<p>A E9.5:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Algunos embriones presentan hemorragias en la cavidad del saco vitelino lo que conduce a una falta de sangre en la vasculatura de este tejido.</li> <li>• Los vasos sanguíneos del saco vitelino están distendidos, prácticamente carentes de células circulantes y con un menor número de células endoteliales.</li> <li>• Hemorragias presentes a lo largo del tronco del embrión debido a una desorganización del endotelio de la aorta dorsal, que muestra una disminución de células endoteliales.</li> <li>• Entre un 30-80% menos de células endoteliales a E8.5 y E9.5 respectivamente.</li> </ul>	(Dumont et al, 1994) (Sato et al, 1995)
	<i>Fli1</i>	E12.5	<p>A E11.5:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Pérdida de la integridad vascular que conduce a hemorragias en el plexo vascular cerebral y meníngeo y en el tronco del embrión.</li> <li>• Pérdida de la expresión de <i>Tie2/Tek</i>.</li> <li>• Los megacariocitos <i>Fli1</i><sup>-/-</sup> presentan un bloqueo en estadios de diferenciación tempranos.</li> <li>• El hígado fetal muestra una drástica reducción del número de CFCs, además de una disminución de pronormoblastos y normoblastos basofílicos.</li> </ul>	(Hart et al, 2000) (Spyropoulos et al, 2000)
	<i>SCL/Tal1</i>	E10-E10.5 (Anemia severa)	<p>A E9.5-E10:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Profunda palidez debido a una ausencia de eritrocitos nucleados.</li> <li>• Por RT-PCR → <i>GATA1</i>, <i>c-Myb</i> y las <i>globinas</i> embrionarias son indetectables, sin embargo, <i>Lmo2</i> se encuentra a niveles normales.</li> <li>• Distensión del pericardio y el endocardio se encuentra colapsado en el lumen del corazón.</li> <li>• Ensayos de diferenciación <i>in vitro</i> muestran que las células ES <i>SCL/Tal1</i><sup>-/-</sup> son incapaces de generar cualquier linaje hematopoyético.</li> </ul>	(Shivdasani et al, 1995b) (Porcher et al, 1996)
	<i>Lmo2/Rbtn2</i>	E10-E10.5 (Anemia severa)	<p>A E9.5:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Retraso del crecimiento y saco vitelino de menor tamaño.</li> <li>• Profunda palidez del embrión y del saco vitelino y carencia de células circulantes en los vasos sanguíneos intra y extraembrionarios.</li> <li>• No se forman islotes sanguíneos en el saco vitelino y ausencia completa de eritropoyesis primitiva.</li> <li>• Las células <i>Lmo2/Rbtn2</i><sup>-/-</sup> son incapaces de formar colonias eritroide <i>in vitro</i> en ensayos de CFU-C.</li> </ul>	(Warren et al, 1994)

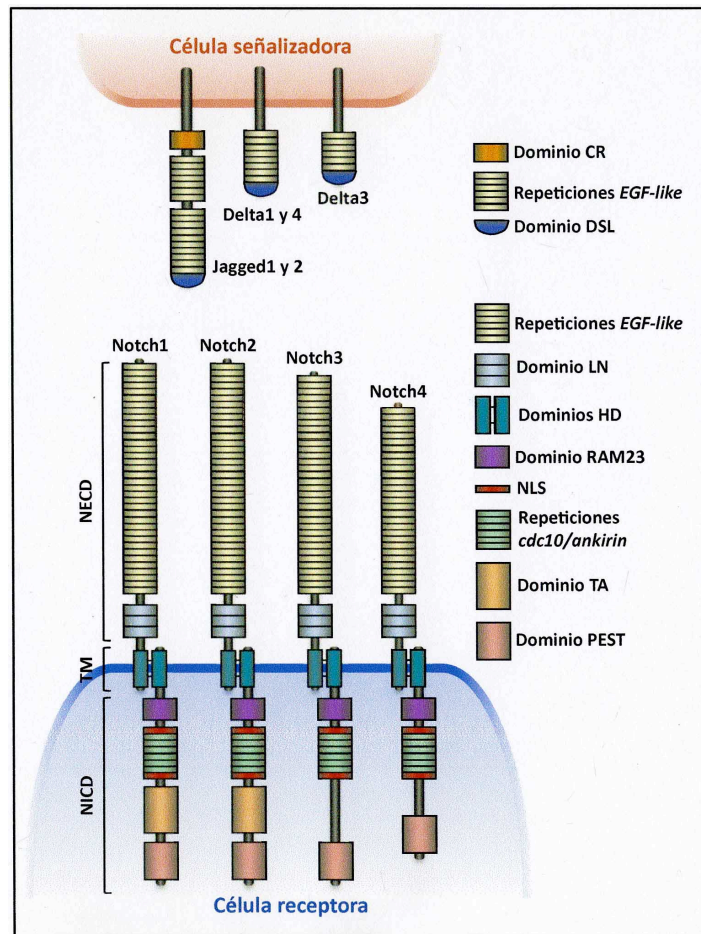
GENES DE HEMATOPOYESIS DEFINITIVA Y HEPÁTICA	GEN	LETALIDAD	FENOTIPO HEMATOPOYÉTICO Y VASCULAR.	REFERENCIAS
	<i>c-Myb</i>	E15.5-16 (Anemia severa)	A E15: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Coloración pálida de los fetos debido a una anemia severa (Hematocrito 10 veces menor que en fetos WT).</li> <li>• La eritropoyesis del saco vitelino no está afectada -nivel normal de eritrocitos nucleados-, mientras que la hepática se encuentra muy disminuida. Otros linajes hematopoyéticos muestran una alteración similar.</li> </ul>	(Mucenski et al, 1991)
	<i>AML1/Runx1</i>	E11.5-E12.5 (Alteraciones de la hematopoyesis hepática)	A E11.5-E12.5: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Carencia de hematopoyesis en el hígado fetal.</li> <li>• Ausencia de progenitores eritroides y mieloides definitivos, ni en el saco vitelino ni en el hígado fetal. Únicamente se detectan eritrocitos primitivos en este último tejido.</li> <li>• Hemorragias en el sistema nervioso central.</li> <li>• En cultivos <i>in vitro</i> de células del saco vitelino no se generan colonias de tipo eritroide y mieloide.</li> <li>• A E9.5, nivel de expresión de <i>PU.1</i> indetectable.</li> </ul>	(Okuda et al, 1996) (Wang et al, 1996) (Okada et al, 1998)
	<i>GATA 2</i>	E10.5-E11.5 (Anemia severa)	A E9.5: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Saco vitelino notablemente pálido.</li> <li>• Disminución de 2-7 veces en el número total de células sanguíneas.</li> <li>• maduración eritroide aparentemente normal, aunque los embriones <i>gata2<sup>-/-</sup></i> muestran una marcada anemia por un bloqueo en la hematopoyesis primitiva.</li> <li>• Defecto autónomo celular en el potencial hematopoyético de las células ES <i>gata2<sup>-/-</sup></i>: descenso de la generación <i>in vitro</i> de eritrocitos primitivos y definitivos, macrofagos y mastocitos.</li> </ul>	(Tsai et al, 1994)
	<i>GATA3</i>	E11.5-E12 (Anemia severa)	A E11.5: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Hemorragias internas masivas y retraso del crecimiento.</li> <li>• Malformaciones severas del cerebro y de la médula espinal.</li> <li>• Hematopoyesis aberrante del hígado fetal.</li> <li>• Las células ES <i>GATA3<sup>-/-</sup></i> carecen del potencial de generación de timocitos y células T periféricas maduras.</li> <li>• Las células T <i>GATA3<sup>-/-</sup></i> se encuentran bloqueadas en el estadio más temprano de desarrollo de los timocitos (DN1: CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>+</sup>) o incluso antes.</li> </ul>	(Pandolfi et al, 1995) (Ting et al, 1996)

GENES DE DIFERENCIACIÓN ESPECÍFICOS DE LINAJE	GEN	LETALIDAD	FENOTIPO HEMATOPOYÉTICO Y VASCULAR.	REFERENCIAS
	<i>GATA 1</i>	E10.5-E11.5 (Anemia severa)	A E9.5-E10.5: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Extrema palidez por el bloqueo de las células eritroides en el estadio de proeritroblasto.</li> <li>• Activación génica de los genes de las globinas en el saco vitelino.</li> <li>• Las células ES <i>GATA1</i><sup>-/-</sup> generan precursores eritroides bloqueados en el estadio de proeritroblasto que sufren apoptosis.</li> </ul>	(Weiss & Orkin, 1995) (Fujiwara et al, 1996)
	<i>KLF1/EKLF</i>	E14 (Anemia severa)	A E12.5-13.5: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Eritropoyesis del saco vitelino no alterada.</li> <li>• El hígado es de menor tamaño con una coloración pálida por la falta de hemoglobina.</li> <li>• Déficit de eritrocitos en la circulación vitelina y umbilical.</li> <li>• Eritrocitos del hígado fetal anormales: morfología irregular y pobre hemoglobinización.</li> </ul>	(Nuez et al, 1995) (Perkins et al, 1995)
	<i>KLF2</i>	E12.5-E14.5 (Hemorragias intraembrionarias severas)	A E9.5-10.5: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Retraso del crecimiento y anemia.</li> <li>• Reducción significativa de la expresión de las globinas <math>\epsilon</math> y <math>\beta</math>H1.</li> <li>• Aumento importante del número de eritrocitos primitivos que sufren apoptosis.</li> <li>• Morfología anormal de los eritrocitos maduros del saco vitelino.</li> </ul>	(Basu et al, 2005)
	<i>Epo/EpoR</i>	E13.5 (Anemia severa)	A E12: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Aspecto pálido del hígado fetal y del saco vitelino.</li> <li>• Los vasos sanguíneos del saco vitelino muestran una carencia severa de células circulantes.</li> <li>• El hígado contiene principalmente eritrocitos nucleados de gran tamaño del saco vitelino y una notable ausencia de eritrocitos definitivos en los últimos estadios de maduración.</li> <li>• Descenso del número total de progenitores eritroides (BFU-E y CFU-E) en el hígado fetal.</li> </ul>	(Wu et al, 1995) (Lin et al, 1996)
	<i>PU.1</i>	E17.5-E18 (Anemia)	A E14.5-E17.5: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Anemia y disminución del hematocrito con variable severidad.</li> <li>• Expresión normal de las globinas fetales.</li> <li>• Número normal de progenitores de eritrocitos y megacariocitos, pero bloqueo en la maduración de los primeros.</li> <li>• Defecto multilinaje en la generación de los progenitores de células B y T, monocitos y granulocitos <i>in vitro</i>.</li> </ul>	(Scott et al, 1994) (McKercher et al, 1996)



## La vía de señalización Notch.

Notch es una vía de señalización local que regula la determinación, diferenciación y el patrón de destino celular en múltiples tejidos durante el desarrollo embrionario (revisado en Bolos et al, 2007). Notch fue descrito por primera vez en 1917 por Thomas Hunt Morgan (Morgan, 1917) al estudiar una cepa mutante de *Drosophila melanogaster* que presentaba el margen distal del ala serrado. En 1985 el grupo de S. Artanavis-Tsakonas identificó gen responsable de este fenotipo: *dnotch* (Wharton et al, 1985) y pocos años después, el ortólogo humano fue descrito en pacientes de leucemia linfoblástica aguda de células T (T-ALL; Ellisen et al, 1991).



**Figura 5.** Representación esquemática de receptores y ligandos de la vía de señalización Notch. En la célula señalizadora están representados los cinco ligandos (Delta 1, 3 y 4, y Jagged 1 y 2) y anclados a la membrana de la célula adyacente, los cuatro receptores (Notch1-4) que se han descrito en mamíferos. En su región extracelular, todos los ligandos poseen un número variable de repeticiones *EGF-like* y el dominio *DSL*, de interacción con el receptor; además, Jagged 1 y 2 contienen una secuencia rica en cisteínas (Dominio *CR*) próxima a la membrana celular. La estructura de los receptores es más compleja, con la característica de que forman un heterodímero con un dominio extracelular (*NECD*) y otro intracelular (*NICD*), que tras la interacción con el ligando es liberado y translocado al núcleo donde lleva a cabo funciones de regulación transcripcional. Ambos dominios se encuentran separados por la región transmembrana (*TM*). Modificado de (Bolos et al, 2007).

Los genes *Notch* codifican receptores transmembrana de tipo I (cuyo peso molecular es 300 kDa) que están altamente conservados a lo largo de la evolución. En



mamíferos se han identificado 4 receptores, de Notch1 a Notch4 (Del Amo et al, 1992; Lardelli et al, 1994; Uyttendaele et al, 1996; Weinmaster et al, 1992). La región extracelular de Notch (**NECD**, Figura 5) está formada por un número variable de repeticiones del dominio *Epidermal Growth Factor (EGF)-like*<sup>2</sup> (Fehon et al, 1990; Rebay et al, 1991), esenciales para la unión a los ligandos, seguido por tres repeticiones *cysteine-rich Notch/Lin12* (LN), que evitan la señalización en ausencia de ligando. La porción transmembrana (**TM**) contiene el dominio de *heterodimerización* (HD), mientras que la porción intracelular (**NICD**) está compuesta por un dominio *RAM23* (Tamura et al, 1995), seis repeticiones *ankyrin/cdc10* (Blank et al, 1992), 2 señales de localización celular (**NLS**) –sólo presentes en Notch1 y Notch2–, un dominio de transactivación (**TA**) y una secuencia **PEST**, que regula la vida media del NICD en el núcleo (Rechsteiner, 1988).

Notch es sintetizado en el Retículo Endoplasmático como una única proteína y a su paso por el Aparato de Golgi, sufre modificaciones post-traduccionales. Las más importantes son la digestión proteolítica en el dominio transmembrana (**corte S1**, Figura 6), llevado a cabo por una *Furin-like convertase* (Logeat et al, 1998) y la glicosilación por las glicosil-transferasas de la familia *Fringe* (Bruckner et al, 2000; Moloney et al, 2000) que modifican su afinidad por unos ligandos respecto de otros (Haltiwanger, 2002; Panin et al, 1997), como detallamos más adelante. De esta manera, el receptor Notch es transportado a la membrana citoplasmática como un heterodímero (Blaumueller et al, 1997).

Los ligandos de Notch se encuentran a su vez anclados a la membrana citoplasmática y en mamíferos, se han descrito dos familias (Figura 5): **Delta**, formada por Delta1 (Dll1; Bettenhausen et al, 1995), Delta3 (Dll3; Dunwoodie et al, 1997) y Delta4 (Dll4; Shutter et al, 2000b), y **Serrate/Jagged** compuesta por Jagged1 (Jag1; Lindsell et al, 1995) y Jagged2 (Jag2; Shawber et al, 1996). Estos ligandos están formados desde su extremo N-terminal, por un dominio llamado **DSL** (de *Delta*, *Serrate*, *Lag2* en *D. melanogaster*, *X. laevis* y *D. rerio*, respectivamente) altamente conservado en la evolución, que interacciona específicamente con las repeticiones *EGF-like* del receptor; seguido, a su vez, por un número variable de dichas repeticiones. Sólo los ligandos Jag1 y Jag2 poseen, además, una secuencia rica en cisteínas (dominio CR) en la región más proximal a la membrana plasmática.

Una vez que se produce la interacción específica entre ligando y receptor de ambas células vecinas, las ubiquitina ligasas **Mind bomb** (Itoh et al, 2003; Le Borgne & Schweisguth, 2003) y **Neuralized** (Deblandre et al, 2001; Lai et al, 2001; Pavlopoulos et al, 2001) ubiquitinan el dominio intracelular del ligando activando su endocitosis (Figura 6). Este fenómeno permite que la metaloproteasa **TACE** (*Tumour necrosis factor-Alpha-Converting-Enzyme*) realice un corte proteolítico en el NECD (**corte S2**, Figura 6) en la porción más proximal a la membrana citoplasmática (Mumm et al, 2000; Parks et al, 2000), siendo endocitado por la célula señalizadora debido a su unión al ligando (Kopan & Goate, 2002; Parks et al, 2000).

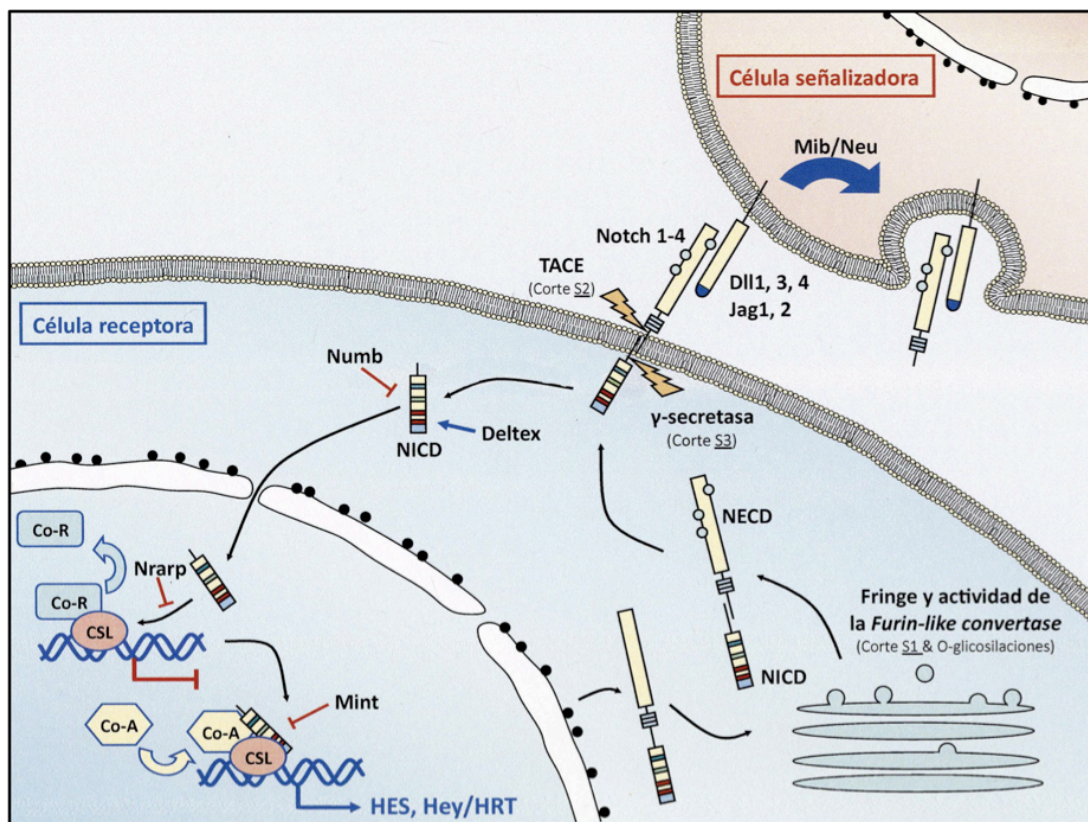
Este evento permite a su vez, que la actividad *γ-secretasa* de un complejo proteico asociado a la cara interna de la membrana de la célula receptora -formado principalmente por presenilinas y nicastrina (Kopan & Goate, 2002)-, corte de nuevo al receptor (**corte S3**, Figura 6) liberando al citoplasma el NICD. Por sus dos NLS, NICD es translocado al núcleo donde se une a través de su dominio RAM23 al dominio **IPT** (*Immunoglobulin-like fold, Plexins and Transcription factors*) de un factor de transcripción genéricamente denominado

---

<sup>2</sup> 36 repeticiones en Notch1 y Notch2, 34 en Notch3 y 29 en Notch4.

**CSL** (*CBF1*, *Suppressor of hairless* y *Lag1* en *H. sapiens*, *D. melanogaster* y *C. elegans* respectivamente), RBPJK en ratón.

RBPJK se une a la secuencia consenso CGTGGGAA (Tun et al, 1994) en los promotores de sus genes diana, inhibiendo la actividad transcripcional por su unión a moléculas correpresoras –SMRT/NcoR (Kao et al, 1998) y SHARP/MINT/SPEN (Oswald et al, 2005)– y a histona deacetilasa (HDAC; Morel et al, 2001). En su unión con RBPJK (Figura 6), NICD desplaza los correpresores y la HDAC y recluta coactivadores –Mastermind-like 1 (Wu et al, 2000) e histona acetil transferasa (Kurooka & Honjo, 2000), entre otros– mediante la proteína SKIP. Los genes diana de NICD/RBPJK más estudiados son factores de transcripción del tipo *basic helix-loop-helix* (bHLH). Algunos de los mejor caracterizados en ratón pertenecen a las familias HES (*Hairy/Enhancer of Split*) y Hey/HRT.



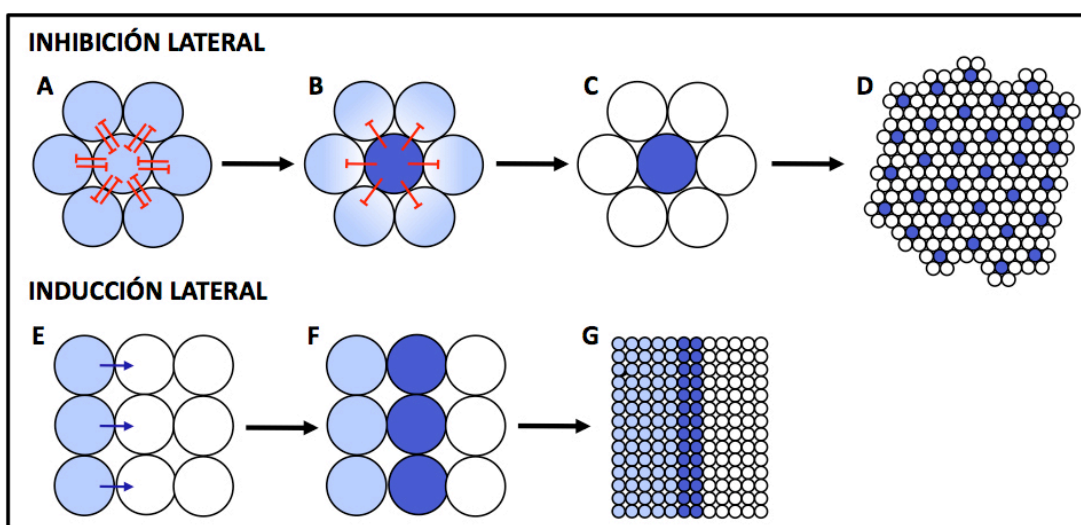
**Figura 6.** Vía de señalización Notch. Tras el procesamiento S1 y la O-glicosilación, el receptor Notch pasa a la membrana plasmática como heterodímero donde interacciona con el ligando. Esto permite dos proteólisis sucesivas del receptor liberan que al citoplasma su dominio intracelular (NICD). NICD se transloca al núcleo donde se une específicamente a RBPJK para activar al transcripción de los genes diana. Adaptado de (Ilagan & Kopan, 2007).

Se han descrito varios moduladores de la señalización Notch a nivel extracelular, citoplasmático y nuclear. En primer lugar, ciertos aminoácidos de treonina o serina de las repeticiones *EGF-like* de los receptores pueden sufrir la acción de **O-fucosiltransferasas** que añaden residuos de fucosa necesarios para la unión eficiente entre ligando y receptor (Okajima & Irvine, 2002; Okajima et al, 2003). De la misma manera, como ya hemos comentado, la adición de N-acetilglucosamina mediada por la glicosilasas de la familia **Fringe** (Figura 6), restringe la activación del receptor por los ligandos Delta, mientras que inhibe la señalización a través de los ligandos Jagged (Haines & Irvine, 2003; Haltiwanger,

2002). Por otro lado, las proteínas citoplasmáticas **Deltex1** y **Numb** regulan de manera positiva y negativa respectivamente, la activación de la vía (Frise et al, 1996; Matsuno et al, 1995) mientras que **Nrarp** y **Mint**, lo hacen en el núcleo (Figura 6). Nrarp interacciona con NICD y CSL inhibiendo la actividad del complejo (Yun & Bevan, 2003) y Mint compete con NICD por la unión a CSL (Kuroda et al, 2003; Oswald et al, 2002) de forma que ambas proteínas tienen un efecto inhibitorio sobre la señalización.

La vía Notch está implicada en procesos de segregación de destinos celulares en múltiples tejidos durante el desarrollo embrionario desde organismos invertebrados hasta los vertebrados más evolucionados. En la vía existen procesos de retroalimentación entre el receptor y el ligando que permiten una correlación entre el destino de células adyacentes y el control detallado del patrón espacial de diferenciación (Lewis, 1998). De esta manera, clásicamente se ha involucrado a Notch en dos tipos de procesos: la *inhibición lateral* y la *inducción lateral*.

La *inhibición lateral* consiste en que la activación del receptor en una célula inhibe la expresión del ligando en ella misma, consiguiendo así que un grupo de células inicialmente equivalentes adquieran destinos diferentes. El resultado final es la formación de un patrón de expresión del ligando que es mosaico, del tipo “sal y pimienta” (Figura 7A-D). Por otro lado, la *inducción lateral* es el proceso por el que la activación del receptor conlleva a la expresión del ligando en esa misma célula. El objetivo es conseguir que un conjunto de células adquieran un destino determinado de forma cooperativa, comportándose como un campo embrionario y generando bordes de expresión génica (Figura 7A-D).



**Figura 7.** Mecanismos de acción clásicos de la vía de señalización Notch. **A-D.** Proceso de *inhibición lateral*. Un campo de células equivalentes (A) que expresan niveles similares de ligando y receptor se ejercen mutuamente señales inhibitorias, hasta que en una de ellas (B) aumenta la expresión del receptor señalizando negativamente a las células que la rodean (C) e impidiendo así que éstas adquieran un destino concreto. El resultado final (D) es un patrón de destinos celulares clásicamente denominado de “sal y pimienta”. **E-G.** Proceso de *inducción lateral* por el que un grupo de células (E) inducen en las células vecinas la expresión del receptor (F), de manera que todas ellas adquieren el mismo destino celular. Este proceso conduce a la formación de bordes de expresión génica. Adaptado de (Lai, 2004).

## Notch en el desarrollo hematopoyético.

El papel de la vía de señalización Notch en el sistema hematopoyético ha constituido un campo de intenso estudio por parte de numerosos grupos de investigación en las últimas décadas. Gracias a los avances de las técnicas de manipulación genética y los ensayos tanto de falta como de ganancia de función de Notch en la hematopoyesis adulta y en la fetal, se han podido ir perfilando funciones esenciales de la vía en los procesos de generación, mantenimiento y homeostasis de las HSCs y los diferentes linajes procedentes de ellas. De esta manera, alteraciones selectivas de la vía producen situaciones patológicas graves.

### El patrón de expresión de Notch en los tejidos hematopoyéticos embrionarios y adultos.

La primera evidencia de la posible implicación de Notch en el desarrollo hematopoyético, vino del estudio de la expresión de *TAN1*, el homólogo humano del gen *dNotch* de *D. melanogaster*. Así se determinó que Notch1 se expresaba en progenitores hematopoyéticos CD34<sup>+</sup> de la médula ósea (Milner et al, 1994) y estudios posteriores mostraron la co-expresión de Notch2 en esas mismas células (Ohishi et al., 2000), indicando una función primordial en estos progenitores hematopoyéticos inmaduros.

*Notch4* presenta un patrón de expresión exclusivo en células endoteliales fetales y adultas (Uyttendaele et al, 1996), así como *Dll1* que se expresa fuertemente en la mayor parte de la vasculatura embrionaria y *Dll4* que queda restringido al endotelio arterial (Shutter et al, 2000a). Además, *Jag1* y *Dll1* están expresados también en las células de músculo liso subendoteliales. De hecho, los embriones deficientes en estos dos ligandos presentan hemorragias en el cerebro y la médula espinal que son letales entre E10-11, reflejando una posible alteración de la integridad vascular.

A su vez, *Notch1*, *Notch4*, *Dll4*, *Jag1* y *Jag2* se expresan en el endotelio de la aorta dorsal en la región de la P-Sp/AGM a E9.5 así como *Hes1*, *HRT1* y *HRT2*, dianas directas de Notch (Robert-Moreno et al, 2005), indicando que la señalización se encuentra activa en estas células. De hecho, se ha mostrado recientemente la activación de la vía a través del receptor Notch1 en los precursores de los islotes sanguíneos del saco vitelino y en la vasculatura en desarrollo del alantoides a E7.5 (Del Monte et al, 2007), que a partir de E8.5 se restringe al endotelio arterial y endocardio (Del Monte et al, 2007) y a los *clusters* hematopoyéticos de la aorta dorsal donde se comienza a detectar a E9.5-10 (Del Monte et al, 2007; Robert-Moreno et al, 2008).

### Función de Notch en la hematopoyesis adulta.

En la hematopoyesis adulta, la función de Notch mejor caracterizada es en el desarrollo de las células T (revisado en Tanigaki & Honjo, 2007). Notch1 es el único ejemplo de un gen que es crucial para el desarrollo normal del linaje T en el timo (Pui et al, 1999; Radtke et al, 1999), promoviendo la proliferación, diferenciación y supervivencia de los progenitores linfoides más tempranos (revisado en Radtke et al, 2004). De este modo, la pérdida de función de Notch1 conduce a un aumento de la población B a expensas de la T, mientras que la sobreactivación de este receptor produce la ausencia de células B y una producción ectópica extratímica de células T (Pui et al, 1999). De hecho, estudios recientes muestran que Notch1 regula directamente la activación transcripcional de *GATA3* (Amsen et al, 2007; Fang et al, 2007), gen esencial para la diferenciación de las células T.

Como hemos dicho anteriormente, el homólogo humano del gen *dnotch* de *D. melanogaster*, fue identificado en pacientes de leucemia linfoblástica aguda de células T (T-ALL; Ellisen et al, 1991), debido a la translocación cromosómica t(7;9)(q34;q34.3) que localiza el gen *Notch1* bajo los elementos reguladores del *receptor β de células T (TCRβ)* resultando en la activación constitutiva de *Notch1* en esas células. No obstante, este tipo de reordenamiento no es frecuente en este tipo de leucemias. De hecho, se ha descrito que el 50% de los pacientes de T-ALL son portadores de mutaciones puntuales en el dominio de heterodimerización o en la secuencia PEST (Figura 5; Weng et al, 2004) que conducen igualmente a la sobreactivación constitutiva de la vía. La T-ALL es un subtipo de leucemia muy agresivo que cursa con una alteración en la maduración de los timocitos. A menudo, el proceso tumoral comienza en el timo pero rápidamente se extiende por todo el organismo. La activación constitutiva de Notch en los timocitos contribuye no sólo a la inducción, sino también al mantenimiento de la enfermedad (revisado en Grabher et al, 2006). De hecho, está descrito que en el ratón, la sobre-expresión de N1ICD (Figura 6) induce exclusivamente leucemias clonales de células T inmaduras (Pear et al, 1996).

Asimismo, experimentos recientes con líneas celulares derivadas de T-ALL han revelado que en este contexto tumoral, el oncogén *c-Myc* es una diana directa de Notch1 (Palomero et al, 2006; Sharma et al, 2006; Weng et al, 2006) y que ambos regularían programas transcripcionales que estarían interconectados y que contribuirían a la prognosis de la enfermedad.

Por otro lado, en el animal adulto, existe un patrón de expresión de los componentes de la vía Notch muy característico en los llamados *nichos hematopoyéticos* de la médula ósea. Estos nichos proporcionan un microambiente particular que constituye el reservorio de las HSCs, a partir de las cuales se van generando todos los linajes hematopoyéticos a lo largo de la vida del individuo (Figura 1). En estos nichos se pueden distinguir a grandes rasgos dos poblaciones celulares: las células estromales y las hematopoyéticas. De esta manera, los receptores de la vía –concretamente *Notch1*, 2 y 3– se expresan exclusivamente en el compartimento hematopoyético, mientras que los ligandos –*Jag1*, *Dll1* y *Dll4*– lo hacen en las células estromales ; (Karanu et al, 2001; Walker et al, 2001) sugiriendo fenómenos de comunicación intercelular entre ambas poblaciones a través de la vía Notch. Entre las células estromales, podemos destacar los osteoblastos, adheridos a los cuales se encuentran las HSCs (Zhang et al, 2003).

#### Funciones de la vía de señalización Notch en el desarrollo hematopoyético.

La primera aproximación experimental que demostró un papel esencial de Notch en la generación de las primeras LT-HSCs embrionarias, vino de estudios con embriones deficientes en *Notch1* (Conlon et al, 1995; Swiatek et al, 1994). Experimentos de cultivo de explantes de P-Sp sobre células estromales OP9 mostraron que los embriones *Notch1*<sup>-/-</sup> presentaban una ausencia prácticamente total de progenitores hematopoyéticos intraembrionarios, mientras que el número de CFCs en el saco vitelino mutante era normal, indicando una restricción funcional de Notch1 en el desarrollo de la hematopoyesis definitiva embrionaria (Kumano et al, 2003). De hecho, este defecto era debido a una alteración en la especificación de las células hematopoyéticas a partir de las endoteliales (Kumano et al, 2003). Estos resultados fueron posteriormente corroborados en ensayos con células ES que mostraron la incapacidad de las células ES deficientes en *Notch1* para producir LT-HSCs (Hadland et al, 2004).

Estudios posteriores con modelos de ratón deficientes para otros de los componentes de la vía –*RBPJk*, *Jag1* y *Mib1*– han revelado que alteraciones funcionales de la señalización conducen siempre a una reducción casi completa de la hematopoyesis definitiva y de la generación de las LT-HSCs en las grandes arterias intraembrionarias. En la Tabla 2, hemos resumido el fenotipo de estos ratones. Sin embargo, cuál es el mecanismo molecular por el cual actúa Notch durante el desarrollo hematopoyético y cuáles son sus *partners* y/o genes diana que llevan a cabo la *ulterior* señalización, han sido algunos de los interrogantes abordados por las investigaciones de los últimos años, incluyendo el trabajo recogido en esta tesis doctoral.

Por un lado, la activación de Notch1 inhibe el desarrollo eritroide *in vitro* de la línea celular de eritroleucemia humana K562, no actuando sobre la expresión de *GATA1* (Lam et al, 2000), sino inhibiendo su función, mediante la activación de una de las dianas clásicas de Notch, *HES1* (Ishiko et al, 2005). A su vez, los ratones deficientes para el efector de la vía, *RPBJK* (Tabla 2; Oka et al, 1995), presentan un incremento del número de células de linaje eritroide Ter119<sup>+</sup> en el saco vitelino por una disminución en la apoptosis (Robert-Moreno et al, 2007). Estos trabajos sugieren un papel inhibitorio de Notch sobre el destino eritroide. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que la activación constitutiva de Notch1 regula positivamente la diferenciación y maduración *in vitro* de las HSCs hacia el linaje de monocitos/megacariocitos (Mercher et al, 2008).

En segundo lugar, existen evidencias de que Notch activa dos genes esenciales para el establecimiento la hematopoyesis definitiva en el embrión: *AML1/Runx1* y *GATA2*. En cuanto a *AML1/Runx1*, investigaciones en el pez cebra (Burns et al, 2005) y en el ratón (Nakagawa et al, 2006) sugieren la existencia del llamado *eje Notch-Runx* como una vía crucial para la generación de los progenitores hematopoyéticos definitivos, donde *AML1/Runx1* sería el mediador directo de la señalización de Notch.

A su vez, varios estudios muestran una relación funcional estrecha entre Notch y *GATA2*. Por un lado, Notch mantiene la expresión de *GATA2* para inhibir la mielopoyesis tanto en la línea celular de progenitores mieloides 32D (Kumano et al, 2001), como en progenitores hematopoyéticos derivados de células ES o del hígado fetal (de Pooter et al, 2006). Así mismo, estudios con embriones mutantes *RPBJk* (Oka et al, 1995) sugieren una activación transcripcional directa de *GATA2* por N1ICD/*RPBJK* (Robert-Moreno et al, 2005).

Por último, un trabajo reciente demuestra que Notch induce la ubiquitinación y degradación de la proteína SCL/Tal1 en células NIH3T3 (Nie et al., 2007)

De esta manera, podemos afirmar que Notch actúa a lo largo de la ontogenia hematopoyética -durante el desarrollo embrionario y la vida adulta- en consonancia con otros factores de transcripción, desde los primeros estadios de especificación de los precursores hematopoyéticos, hasta las decisiones celulares de especificación y maduración de linajes más avanzados.

**Tabla 2.** Fenotipo hematopoyético de los embriones deficientes para algunos genes de la vía de señalización Notch.

GEN	LETALIDAD	FENOTIPO HEMATOPOYÉTICO Y VASCULAR.	REFERENCIAS
<i>Notch1</i>	E10-E10.5 (Defectos cardíacos y anemia severa)	A E9.5: <ul style="list-style-type: none"> <li>Ausencia de progenitores hematopoyéticos en la P-Sp, mientras que la hematopoyesis del saco vitelino está preservada.</li> <li>Descenso de la expresión de <i>SCL</i>, <i>Lmo2</i>, <i>GATA1</i>, <i>GATA2</i> y <i>AML1/Runx1</i> en la P-Sp <i>Notch1</i><sup>-/-</sup>.</li> <li>Carencia de LT-HSCs en el la P-Sp y saco vitelino de los embriones <i>Notch1</i><sup>-/-</sup>.</li> </ul>	(Kumano et al, 2003) (Hadland et al, 2004)
<i>RBPJk</i>	E10-E10.5 (Defectos cardíacos y anemia severa)	A E9.5: <ul style="list-style-type: none"> <li>Ausencia completa de LT-HSCs de la hematopoyesis definitiva intraembrionaria.</li> <li>Pérdida de la expresión de <i>AML1/Runx1</i>, <i>Gata2</i> y <i>SCL/TAL1</i> en la aorta dorsal del la AGM.</li> <li>Expansión del territorio de expresión de <i>VE-Cad</i> y <i>CD31</i>.</li> <li>Porcentaje de células Ter119+ en el saco vitelino aumentado por una disminución de la apoptosis en los progenitores eritroides.</li> </ul>	(Robert-Moreno et al, 2005) (Robert-Moreno et al, 2007)
<i>Jagged1</i>	E12.5 (Defectos vasculares y hematopoyéticos)	A E10.5-E11: <ul style="list-style-type: none"> <li>Disminución del 50% en la frecuencia de LT-HSCs en el endotelio de la aorta dorsal y descenso drástico del número total de progenitores de la región de la AGM.</li> <li>Especificación arterial normal en los embriones <i>Jag1</i><sup>-/-</sup>.</li> <li>Ausencia completa de expresión de <i>GATA2</i> y disminución de la de <i>AML1/Runx1</i> en las células endoteliales de la aorta.</li> </ul>	(Robert-Moreno et al, 2008)
<i>Mib1</i>	E10.5-E11.5	A E9.5: <ul style="list-style-type: none"> <li>Hematopoyesis del saco vitelino no alterada, mientras que la generación de progenitores de todos los linajes hematopoyéticos en la P-Sp está completamente bloqueada.</li> <li>La expresión de marcadores de endotelio hemogénico en la P-Sp/AGM aparece normal.</li> </ul>	(Yoon et al, 2008)





OBJETIVOS



Como hemos descrito en la *Introducción*, igual que en otros muchos tejidos, la vía de señalización Notch desempeña un papel crucial durante el desarrollo hematopoyético. De esta manera, los modelos de falta de función de la vía muestran un fenotipo que es letal embrionario con una afectación severa, entre otras, de la hematopoyesis definitiva (Tabla 2) siendo más leve el efecto sobre la onda hematopoyética temprana del saco vitelino.

Estudios recientes han demostrado que la vía de señalización a través del receptor Notch1 está activa en el embrión de ratón a E7.5 en los precursores de los islotes sanguíneos y en la vasculatura en desarrollo del alantoides (Del Monte et al, 2007). A partir de E8.5, su expresión se restringe al endotelio arterial y endocardio (Del Monte et al, 2007) y en los *clusters* hematopoyéticos de la aorta dorsal comienza a E9.5-10 (Del Monte et al, 2007; Robert-Moreno et al, 2008). Estos resultados junto con el hecho de que la activación constitutiva de N1ICD sea el origen del 50% de los casos de T-ALL en el hombre (revisado en Grabher et al, 2006; Weng et al, 2004), nos condujo a un diseño experimental de ganancia de función de la vía Notch específicamente en los progenitores hematovasculares Tie2<sup>+</sup> desde estadios tempranos de desarrollo en ratón (E7.5; ver *Materiales y Métodos*).

Como hemos detallado anteriormente (Tabla 1), el gen *Tie2* (receptor de Angiopoyetina 1) se expresa en los angioblastos y progenitores hematopoyéticos del saco vitelino, así como en el endotelio embrionario y en los precursores hematopoyéticos de la pared ventral de la aorta (Dumont et al, 1992; Kisanuki et al, 2001). La función de *Tie2* es necesaria para la vasculogénesis del embrión (Tabla 1; Sato et al, 1995), pero es dispensable para la emergencia de las células hematopoyéticas definitivas y para la hematopoyesis hepática (Hamaguchi et al, 2006; Iurlaro et al, 2003; Puri & Bernstein, 2003; Takakura et al, 1998).

De esta manera, al comienzo de la tesis nos planteamos una serie de objetivos a responder que detallamos a continuación:

1. Papel de la vía de señalización Notch en la emergencia de la hematopoyesis primitiva y definitiva a partir de progenitores hematovasculares.
2. Analizar la función de Notch en las HSCs/progenitores multipotenciales embrionarios. Determinar cambios poblacionales y alteraciones funcionales secundarios a su activación constitutiva.
3. Estudiar el efecto de la sobre-expresión del N1ICD en la regulación de las tasas de proliferación y apoptosis hematopoyética en el embrión post-gastrulación.
4. Papel de Notch en la especificación, diferenciación y maduración de precursores mieloides y eritroides embrionarios.
5. Las consecuencias de la activación constitutiva de Notch sobre las redes de regulación génica que promueven la hematopoyesis embrionaria.
6. Establecer un modelo acerca de la función de Notch en la emergencia de la hematopoyesis embrionaria desde sus primeros estadios de desarrollo.

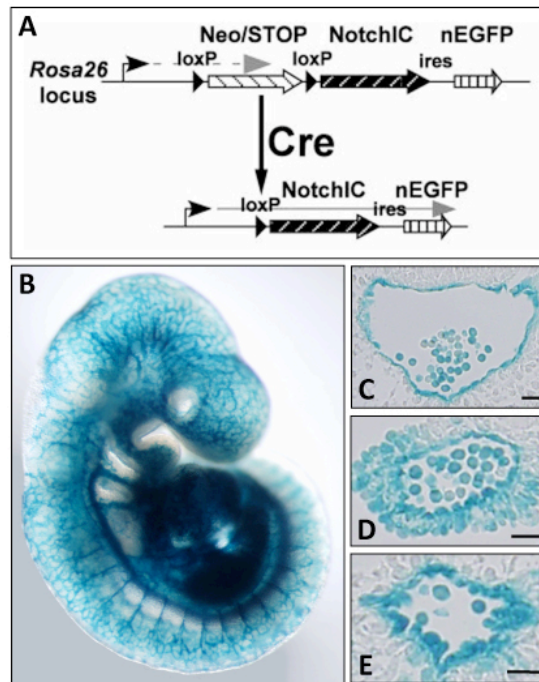


# MATERIALES Y MÉTODOS



## Ratones transgénicos.

Utilizamos dos cepas de ratones transgénicos que cruzamos entre sí: la primera de ellas expresa el dominio intracelular del receptor Notch1 (N1ICD) acoplado a la secuencia de la *nuclear Enhanced Green Fluorescent Protein* (EGFP), bajo el promotor *Rosa26* (Murtaugh et al, 2003; Figura 8A); la segunda línea transgénica expresa la secuencia génica de la recombinasa CRE bajo el promotor del gen *Tie2/TEK* (Kisanuki et al, 2001), que se expresa en los angioblastos y progenitores hematopoyéticos a partir del E7.5 de gestación (Dumont et al, 1994; Dumont et al, 1992).



**Figura 8.** El ratón transgénico *Rosa26-N1ICD/EGFP*. **A.** Estructura del locus *Rosa26-N1ICD/EGFP*. La transcripción (flecha gris) se bloquea inicialmente por el cassette *Neo/STOP*, que es deleciónado tras la acción de la recombinasa CRE, permitiendo la expresión del N1ICD y la EGFP nuclear (nEGFP). Tomado de (Murtaugh et al, 2003). **B.** Tinción X-Gal de un embrión *Tie2CRE/+;Rosa26-lacZ/+* a E9.5 que muestra la expresión del gen *Tie2* a lo largo de toda la vasculatura embrionaria. **C-E.** Secciones a la altura de la región de la AGM de un embrión *Tie2CRE/+;Rosa26-lacZ/+* a E9.5, en la que se aprecia la expresión continua de *Tie2* en el endotelio de la aorta dorsal (**C**), las arterias vitelina (**D**) y umbilical (**E**), así como en la mayoría de células hematopoyéticas circulantes y/o adheridas a la pared vascular.

Mantenemos ambas cepas en homocigosis, de manera que al cruzarlas obtenemos embriones que son heterocigotos para cada transgén, que denominamos *Tie2-CRE/+;N1ICD/+*. En dichos embriones la vía Notch se activa constitutivamente en los progenitores hemato vasculares a partir de E7.5 (Figura 8B-E). Distinguimos los embriones transgénicos de los normales (WT) generados en paralelo por criterios morfológicos.

Los embriones transgénicos fueron genotipados inicialmente por PCR hasta conseguir adultos homocigotos con los que expandir las colonias. Los *primers* y las condiciones de la PCR utilizados fueron los siguientes: N1ICD-FW: GCTGACCTGCGCATGTCTGCCAT y N1ICD-RV: CATGTTGTCTGGATGTTGGCATCTG (Ta=55°C, 1min, 35 ciclos); Tie2CRE-FW: GGGAAGTCGCAAAGTTGTGAGTT y Tie2CRE-RV: CTAGAGCCTGTTTTGCACGTGC (Ta=60°C, 1min, 35 ciclos).

### **Disección de los embriones y preparación de suspensiones celulares.**

Disecamos los embriones en PBS 1X suplementado con 2% de suero bovino fetal (FBS) previamente enfriado a 4°C y los fijamos en paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS 1X 2h. o toda la noche a 4°C según la técnica posterior a realizar.

Para la obtención de suspensiones celulares, disecamos el tejido en PBS 1X con 2% de FBS y disgregamos las células mecánicamente con una jeringa de 1ml y agujas de 0.8mm de diámetro (*BD Bioscience*). Posteriormente pasamos las células por un filtro de 40µm de tamaño de poro (*BD Bioscience*), para eliminar los restos de tejido no disgregados. Los tejidos embrionarios utilizados para la suspensión celular fueron: el *saco vitelino*, la *placenta*, la región de la *AGM* (Aorta-Gónadas-Mesonefros) –porción que comprende desde el primordio de la extremidad anterior hasta la parte más caudal del embrión– y la *sangre periférica* –tras el desangrado de los embriones en presencia de heparina sódica (*Sigma-Aldrich*) –.

### **Detección de la expresión de EGFP *ex vivo*.**

Para visualizar *ex vivo* la expresión de EGFP en embriones transgénicos, tras la disección y sin fijar, montamos en un portaobjetos el tejido embrionario a estudiar con PBS 1X y pusimos un cubreobjetos encima para asegurarnos que quedaba bien aplanado. Para este análisis utilizamos el saco vitelino total y la región más caudal del embrión. Posteriormente sometimos a las preparaciones a un análisis de microscopía confocal multifotón (*Biorad*).

### **Histología y tinción de Hematoxilina y Eosina (H&E).**

Llevamos a cabo el procesamiento de los embriones para las técnicas histológicas mediante pasos sucesivos de deshidratación hasta embeberlos en parafina. A continuación detallamos las soluciones utilizadas, así como los tiempos de incubación y el procedimiento, después de la disección y fijación de los tejidos:

- 2 x 10min PBS 1X.
- 1 x 15min Etanol (EtOH) 50% en agua destilada (ddH<sub>2</sub>O).
- 1 x 15min EtOH 70%.
- 1 x 15min EtOH 80%.
- 1 x 15min EtOH 90%.
- 1 x 15min EtOH 95%.
- 2 x 10min EtOH 100%.
- 3 x 3min Xileno 100%.
- 1 x 30min Xileno:Parafina (1:1).
- 3 x 45min Parafina .

Después del embebido en parafina líquida, orientamos el tejido y los embriones según el tipo de cortes a realizar y dejamos enfriar a temperatura ambiente.

Una vez realizados los cortes del tejido a estudiar en un microtomo automático (*Leica*), llevamos a cabo la tinción de Hematoxilina y Eosina según un protocolo estándar. Brevemente, procedimos al rehidratado y tinción de las secciones, para volver a deshidratar y montar las preparaciones, según detallamos a continuación:

- 3 x 3min Xileno 100%.
- 2 x 2min EtOH 100%.
- 2 x 2min EtOH 90%.
- 1 x 2min EtOH 70%.
- 1 x 2min EtOH 50%.



- 1 x 2min EtOH 30%.
- 1 x 2min ddH<sub>2</sub>O.
- 1 x 5min Hematoxilina de Harris (*Sigma-Aldrich*).
- Lavamos con H<sub>2</sub>O del grifo hasta que salía transparente.
- 1 x 10sec Alcohol ácido (0.5% de HCl en EtOH 70%).
- 3 x 10sec ddH<sub>2</sub>O.
- 1 x 10 min Solución acuosa de Eosina (*Sigma-Aldrich*).
- 1 x 2min EtOH 30%.
- 1 x 2min EtOH 50%.
- 1 x 2min EtOH 70%.
- 1 x 10sec EtOH 90%.
- 1 x 10sec EtOH 100%.
- 3 x 2min Xileno 100%.

Tras el procesamiento, pusimos una gota de *Entellan* (*Merck*) –medio de montaje soluble en xileno–, deslizamos un cubreobjetos sobre ella de forma que se extendiese por toda la preparación y dejamos secar toda la noche.

### **Hibridación *in situ* e inmunohistoquímica $\alpha$ -CD31/PECAM1.**

Utilizamos el procedimiento de hibridación *in situ* descrito por (de la Pompa et al, 1997), usando una sonda reversa de ARN marcada con digoxigenina para el ARN mensajero del gen *AML1/Runx1* de ratón (Robert-Moreno et al, 2005).

Para la inmunohistoquímica  $\alpha$ -CD31/PECAM1, después de la disección, fijamos los embriones y el saco vitelino en *Dent's fix solution* [Metanol (MetOH):DMSO (4:1)] durante toda la noche a 4°C. Tras eliminar la solución de fijado, blanqueamos durante 4-5h a temperatura ambiente y en agitación, con MetOH:DMSO:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (4:1:1), y rehidratamos los embriones:

- 1 x 30min MetOH 50% en PBS 1X.
- 1 x 30min MetOH 25%.
- 2 x 1h PBSMT (2% leche en polvo, 0.3% Triton X-100, 5% DMSO en PBS 1X).

Incubamos con el anticuerpo  $\alpha$ -CD31/PECAM1 (*Pharmingen*) a una concentración de 1:200 en PBSMT durante toda la noche, a 4°C y en agitación. Lavamos 2 x 1h con PBSMT a 4°C y 1h con PBSMT a temperatura ambiente agitándose.

Posteriormente, incubamos con el anticuerpo secundario (*Vectastain, ABC Kit*) a una concentración de 1:500 en PBSMT durante toda la noche a 4°C y en agitación. Lavamos 2 x 1h con PBSMT a 4°C y 1h con PBSMT a temperatura ambiente agitándose. Dejamos lavando toda la noche a 4°C en PBT (2%BSA, 0.3% Triton X-100, 5% DMSO en PBS 1X).

Para el revelado, seguimos el protocolo comercial del *Vectastain, ABC Kit*. Brevemente, diluimos la solución A 1:100 en PBS 1X (tubo A) y la solución B 1:100 en PBS 1X (tubo B). Juntamos ambas soluciones en un único tubo (solución AB) y la incubamos 30min a temperatura ambiente. Lavamos los embriones con PBS 1X y les pusimos la solución AB 30min-1h a temperatura ambiente y en agitación. Lavamos 5 x 5min con PBS 1X y preparamos la solución de diaminobenzidina (DAB) según el protocolo comercial de *Peroxidase Kit* de *Vector*.

Después de un lavado rápido de los embriones con ddH<sub>2</sub>O, añadimos la solución DAB y controlamos el revelado bajo lupa. Paramos la tinción con H<sub>2</sub>O del grifo (2 o 3 lavados) y fijamos con PFA 4% durante 20min a temperatura ambiente y en agitación.

## Citocentrifugación y tinción de May Grunwald-Giemsa.

Después de preparar la suspensión celular, como se ha descrito anteriormente, lavamos bien y contamos el número de células en una cámara Neubauer. La concentración celular óptima para realizar la citocentrifugación es de  $1 \times 10^6$  células/ml. Normalmente contamos unas  $2 \times 10^4$  -  $2.5 \times 10^4$  células por cada 300  $\mu$ l. Añadimos la muestra –no más de 500  $\mu$ l– en la *Cytofunnel*, una cámara con forma de embudo que colocamos sobre el portaobjetos para concentrar las células en un punto y que la centrifugación las extienda sobre la superficie. Centrifugamos las células a 300rpm durante 7min y dejamos secar el portaobjetos 20min a temperatura ambiente. Posteriormente, fijamos la muestra 3min en MetOH 100% y dejamos secar la preparación.

Realizamos la tinción de May Grunwald-Giemsa mediante el protocolo comercial de *Materlab, S.L.* Brevemente, recubrimos la preparación con la solución *May-Grunwald* al 50% en agua destilada (ddH<sub>2</sub>O) durante 3min. Retiramos el tinte por decantación, lavamos con ddH<sub>2</sub>O y preparamos una solución acuosa con el colorante *Giemsa* (1.5 gotas por cada ml de ddH<sub>2</sub>O). Con esta solución recubrimos de nuevo la preparación durante 15-30min. Transcurrido este tiempo, lavamos con ddH<sub>2</sub>O y dejamos secar. Para montar las muestras utilizamos *Depex* (*Panreac*).

## Citometría de flujo y purificación celular.

Para el marcaje de células embrionarias y su posterior análisis por citometría de flujo, realizamos la suspensión celular como se ha descrito anteriormente.

Las células fueron teñidas con anticuerpos monoclonales específicos biotinilados –revelados posteriormente con estreptavidina-ficoeritrina (Strep-PE)–, o marcados con ficoeritrina y/o alofocianina, y analizados en un *FACS Calibur* y/o purificadas en un *DIVA cell sorter* (*Becton Dickinson* (*BD*)), como se describe en (Minguet et al, 2003). Brevemente, bloqueamos las células en PBS 1X suplementado con 2% de FBS y una dilución 1/100 de suero de ratón y 24G2<sup>3</sup> (*cedido por el grupo de M.L. Gaspar, CNM-ISCI*) durante 10 min a 4°C. Después de un lavado PBS 1X suplementado con 2% de FBS, incubamos con el anticuerpo primario correspondiente durante 20min a 4°C y en oscuridad. Lavamos de nuevo con 2% de FBS en PBS 1X e incubamos las células con Strep-PE 15min a 4°C y en oscuridad. Lavamos nuevamente y dejamos las células en un volumen de 100  $\mu$ l de PBS 1X suplementado con 2% de FBS donde añadimos 50  $\mu$ l de yoduro de propidio (*Sigma-Aldrich*) para excluir las células muertas del análisis.

A continuación, detallamos los anticuerpos usados y acoplados a alofocianina (APC), biotina (Bio) o ficoeritrina (PE), así como la dilución que utilizamos y la casa comercial: c-Kit-APC (1/100, *BD*), CD41-PE (1/400, *BD*), CD45-Bio (1/100, *cedido por el grupo de M.L. Gaspar, CNM-ISCI*), CD45-APC (1/200, *BD*), Ter119-Bio (1/400, *BD*), Flk1/KDR-PE (1/100, *BD*), CD71-PE (1/800, *e-bioscience*), Tie2-Bio (1/100, *e-bioscience*), AA4.1-Bio (1/100, *BD*), CD31-PE (1/200, *BD*), CD9-Bio (1/300, *BD*), CD105-PE (1/100, *Mitenyi Biotech*), Strep-PE (1/1000, *BioLegend*), Strep-APC (1/800, *BioLegend*).

Para el análisis del ciclo celular incubamos 10<sup>5</sup> células con el reactivo *Hoescht 33342* (*Invitrogen*) a una concentración de 5  $\mu$ g/ml en medio IMDM (*Lonza*) más 20  $\mu$ M de *verapamil* (*Sigma-Aldrich*) en un volumen final de 200  $\mu$ l, durante 30min a 37°C y en oscuridad. Transcurrido

---

<sup>3</sup> Anticuerpo anti-IgG de ratón utilizado para bloquear los sitios FcR.

este tiempo las muestras se analizan en un *Vantage (BD)* utilizando para este marcaje un láser de ultravioleta. Como control de ciclo celular, examinamos muestras de timo adulto.

Analizamos el nivel de apoptosis celular según el protocolo comercial del *Kit de Immunostep*. Brevemente, después de lavar las células con PBS 1X, concentramos  $10^5$  células en 500µl de *Binding Buffer 1X*. Añadimos a las muestras 4µl de 7AAD (*Kit de Immunostep*) y 4µl de AnexinaV-PE (*Kit de Immunostep*) e incubamos 15min a temperatura ambiente, en oscuridad. Finalmente, añadimos 200µl de *Binding Buffer 1X* a cada muestra para analizarlas posteriormente en un *FACS Calibur (BD)*.

### **Ensayo de formación de colonias hematopoyéticas *in Vitro* (CFU-C).**

Determinamos la frecuencia de progenitores hematopoyéticos embrionarios mediante el cultivo *in vitro* de células procedentes del saco vitelino en medio semisólido (MethoCult M3234, *Stem Cell Technologies*) enriquecido con *Stem Cell Factor* (SCF, *Peprotech*), interleuquina (IL) 3 (cedida por el grupo de M.L. Gaspar, CNM-ISCIII) e IL6 (*Peprotech*) de ratón, y eritropoyetina (EPO) humana (*Peprotech*). Para ello, cultivamos por duplicado diferentes titulaciones celulares en placas de 48 pocillos.

Después de incubar las células 7 días a 37°C, hicimos el recuento de colonias hematopoyéticas, identificadas en base a criterios morfológicos y a su contenido en hemoglobina. Las colonias generadas procedían de tres tipos diferenciados de progenitores hematopoyéticos de linaje eritroide (BFU-E/CFU-E), de granulocitos-monocitos (CFU-GM) y mixtos (CFU-Mix).

### **Extracción de ARN, síntesis de cDNA y PCR.**

Realizamos la extracción de ARN total del saco vitelino completo y de células sorteadas mediante el protocolo comercial de TriReagent (Sigma-Aldrich). Del ARN total sintetizamos los ADN reversos y complementarios (cDNA) a los ARN mensajeros de las células lisadas gracias a un *primer* compuesto por una secuencia de 15 timinas (oligo-dT) y siguiendo el protocolo comercial del Kit de síntesis de cDNA de la AMV-RT (*Roche*).

A partir del cDNA generado del tejido total del YS y de las células sorteadas, procedimos a la amplificación por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) mediante *primers* específicos de los transcritos de interés. Para igualar las cantidades de cDNA de las diferentes muestras, realizamos una PCR a tiempo real en capilares, método de *Light Cycler* (*Roche*), amplificando un gen de expresión ubícueta, en nuestro caso,  $G\alpha^4$ . Para el análisis de los transcritos de interés, hicimos PCR semicuantitativas usando la *Fast Start polymerase* (*Roche*). La secuencia de los *primers* utilizados y las condiciones de las PCRs se detallan en la Tabla 3.

---

<sup>4</sup>  $G\alpha$  corresponde a la subunidad  $\alpha$  de la proteína G de membrana implicada en la transducción de señales.

**Tabla 3.** *Primers* y condiciones usados en los análisis de RT-PCR.

	GEN	SECUENCIA DE LOS <i>PRIMERS</i> (5'-3')	CONDICIONES PCR	TAMAÑO	REFERENCIA
VÍA DE SEÑALIZACIÓN NOTCH	<i>N1ICD</i>	FW*: GCTGACCTGCGCATGTCTGCCAT RV*: CATGTTGTCCTGGATGTTGGCATCTG	Ta*=55°C; 1min; x35	341 bp*	(Fre et al, 2005)
	<i>N1ECD</i>	FW: CCCACTGTGAACTGCCCTAT RV: CCCATTCTTGCAAGTTGTTT	Ta=55°C; 1min; x35	171 bp	Esta tesis
	<i>DII1</i>	FW: ACAGAGGGGAGAAGATGTGC RV: GACAACCTGGGTATCGGATG	Ta=60°C; 1min; x40	174 bp	Esta tesis
	<i>DII4</i>	FW: AAGGTGCCACTTCGGTTACAC RV: AGATGCCACAGGAGCTACAG	Ta=60°C; 1min; x35	531 bp	(Timmerman et al, 2004)
	<i>Jag1</i>	FW: GACCAGAACGGCAACAAACTTGCATGGAA RV: TTGGTCTCACAGAGGCACTGCCAGGGTTCA	Ta=60°C; 1min; x38	224 bp	(Singh et al, 2000)
	<i>Jag2</i>	FW: TCCTGACTGCCGTATCAACA RV: CTGTTGCAGTCTTCCATCCA	Ta=60°C; 1min; x35	210 bp	Esta tesis
	<i>HES1</i>	FW: ACACCGGACAAACCAAGAC RV: TGATCTGGGTCATGCAAGTTG	Ta=55°C; 1min; x35	390 bp	Esta tesis
	<i>HRT1</i>	FW: AGG GTG GGA TCA GTG TGC RV: TGC TTC TCA AAG GCA CTG	Ta=56°C; 1min; x35	355 bp	(Timmerman et al, 2004)
	<i>HRT2</i>	FW: AGGTCCAATTACCGACAAC RV: AGCATGGGCATCAAAGTAGC	Ta=60°C; 1min; x36	243 bp	Esta tesis
	<i>HRT3</i>	FW: GGTCCCCACTGCCTTTGAGA RV: AGGATGGCGAGCTGACTGTTT	Ta=60°C; 1min; x35	381 bp	(Wang et al. 2002)
GENES HEMATOPOYÉTICOS	<i>Fli1</i>	FW: CAACCAGCCAGTGAGAGTCA RV: GCCGTTCTTCTCATCCATGT	Ta=60°C; 1min; x35	160 bp	Esta tesis
	<i>SCL/Tal1</i>	FW: TAGCCTTAGCCAGCCGCTCG RV: GCGGAGGATCTCATTCTTGC	Ta=60°C; 1min; x35	347 bp	Esta tesis
	<i>Ldb1</i>	FW: ACAGAGAGCTCATCCCAGA RV: CTTGTGGCGGACATAAGTT	Ta=60°C; 1min; x35	170 bp	Esta tesis
	<i>Lmo2/Rbnt2</i>	FW: TCGCGAATTCACCATGTCCTCGGCCATCGAAAGGA RV: CGAGTTCTAGACTAGATGATCCATTGATCTTGGT	Ta=60°C; 1min; x38	450 bp	(Shivdasani et al, 1995a)
	<i>c-Myb</i>	FW: AAGCTTGTCAGAAATATGGTCCGAAG RV: GGCTGCCGACGCCGCTGAGGGAC	Ta=58°C; 1min; x35	525 bp	(Minegishi et al, 2003)
	<i>GATA2</i>	FW: TGCAACACACCACCGATACC RV: AATTTGACAACAGGTGCCC	Ta=58°C; 1min; x35	336 bp	(Minegishi et al, 2003)
	<i>AML1/Runx1</i>	FW: CCAGCAAGCTGAGGAGCGGCG RV: CCGACAAACCTGAGGTCGTTG	Ta=62°C; 1min; x38	292bp	(Okuda et al, 1996)
	<i>GATA3</i>	FW: ACGTCTCACTCTCGAGGCAGCATG RV: GAAGTCTCCAGCGGTCATGCAC	Ta=60°C; 1min; x35	600bp	(Wani et al, 1998)
ERITROIDES	<i>GATA1</i>	FW: CCCCTTGAGAGGCCAGAGAGT RV: ACCTGATGGAGCTTGAAATAGAGGC	Ta=61°C; 1min; x35	283 bp	(Shivdasani et al, 1995a)
	<i>EKLF/KLF1</i>	FW: ACCACCTGGGACAGTTTCT RV: GAAGGGTCCTCCGATTTCAG	Ta=60°C; 1min; x35	140 bp	Esta tesis
	<i>KLF2</i>	FW: ACCAAGAGCTCGCACATAAA RV: GTGGCACTGAAAGGGTCTGT	Ta=60°C; 1min; x35	156 bp	Esta tesis
MIELOIDES	<i>PU.1</i>	FW: CGGATGTGCTTCCCTTATCAAA RV: TGACTTTCTCACCTCGCCTGTC	Ta=58°C; 1min; x35	400 bp	Esta tesis
	<i>MPO</i>	FW: ACCTGCTGAAGAGGAAGCTG RV: TTGCAAGTCCAGTGATGGT	Ta=60°C; 1min; x35	172 bp	Esta tesis
	<i>c-fms/CSF-R</i>	FW: GGTGGTGGTGGCTGTATGTCT RV: AAGATGCTAAAGTCCACGGCTCA	Ta=60°C; 1min; x35	318 bp	Esta tesis
	<i>Lyz M</i>	FW: TTCAGATCAATAGCCGATACTGG RV: GAATGCCTTGGGGATCTCTC	Ta=60°C; 1min; x35	150 bp	Esta tesis
BL-CFCs	<i>Fli1/KDR</i>	FW: GGTCTCTGTCAAGTGGCGGT RV: TCTTTCGGTGTGTGCTCTG	Ta=60°C; 1min; x35	237 bp	Esta tesis
	<i>Bry/T</i>	FW: GCCAAAGAAAGAAACGACCA RV: TGACCGGTGGTTCCTTAGAG	Ta=60°C; 1min; x35	204 bp	Esta tesis
VÍA DE WNT	<i>DKK1</i>	FW: GAGGGGAAATTGAGGAAAGC AS: GGTGCACACCTGACCTTCTT	Ta=60°C; 1min; x35	230 bp	Esta tesis
	<i>Wnt5a</i>	FW: AGGAGTTCGTGGACGCTAGA AS: GCCCGCTATCATACTTCTC	Ta=60°C; 1min; x35	241 bp	Esta tesis
	<i>Sfrp1</i>	FW: CGAGTTTGCACTGAGGATGA RV: GCAGGTACTGGCTCTTACC	Ta=60°C; 1min; x35	227 bp	Esta tesis
	<i>Gα</i>	FW: ATTGAAACCATGTGGCCCGCATGAGC RV: GAAGACACGGCGGATGTTCTCAGTGTC	Ta=60°C; 1min; x35	642 bp	Esta tesis

\*FW: Forward primer.

°RV: Reverse primer.

\*Ta: Temperatura de alineamiento.

\*bp: pares de bases.

# RESULTADOS

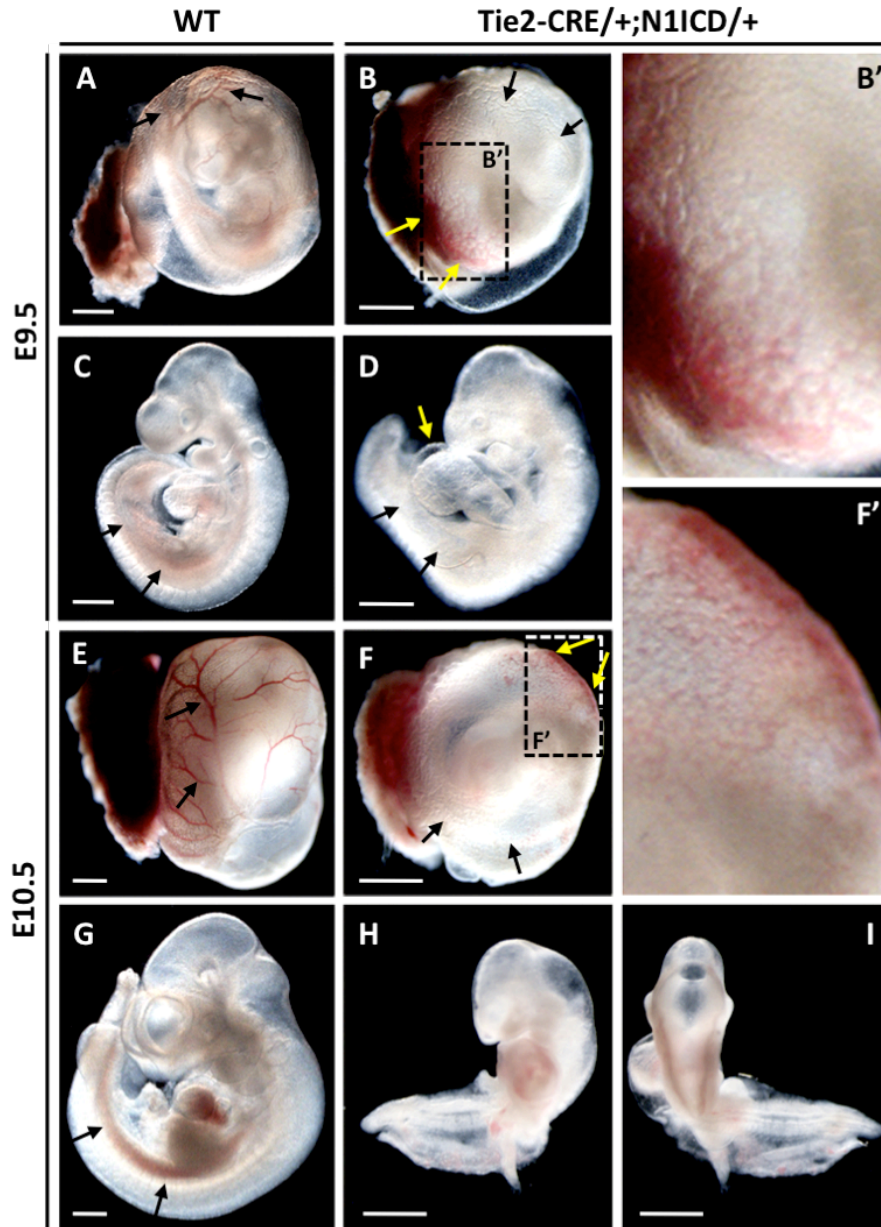


### **La activación constitutiva de la vía Notch en los progenitores hematovasculares causa letalidad embrionaria con alteraciones hematopoyéticas.**

La sobre-activación de la vía Notch en los linajes vascular y hematopoyético a partir de E7.5 causó letalidad embrionaria entre E10-10.5. A E9.5, los embriones transgénicos (Tie2CRE/+;N1ICD/+) presentaban un tamaño menor que los normales (WT, Figura 9C-D, G-H), indicando un retraso del crecimiento, así como una alteración en el desarrollo de la región más caudal (Figura 9H-I). Por otro lado, los embriones Tie2CRE/+;N1ICD/+ mostraban un aumento del volumen del corazón respecto al tamaño corporal y edema en el pericardio (Figura 9D, flecha amarilla) indicativos ambos de una disfunción cardíaca con posibles alteraciones en la contracción y el volumen de eyección. Además de estos rasgos fenotípicos, pudimos observar que tanto de las grandes arterias intraembrionarias –principalmente la aorta dorsal– como el saco vitelino presentaban una coloración pálida (Figura 9A-D), sugiriendo que los embriones transgénicos estaban severamente anémicos. Este cuadro de alteraciones hematovasculares en su conjunto resultan presumiblemente en defectos hemodinámicos que impiden un correcto aporte de oxígeno y nutrientes a todas las células del organismo y la viabilidad más allá de E10-10.5.

Un rasgo característico del saco vitelino del 75-80% de los embriones transgénicos fue el hecho de mostrar dos regiones diferenciadas: la primera, constituida por agregados de células eritroides aparentemente con un contenido de hemoglobina normal (Figura 9B y 9F, flechas amarillas), y una segunda zona que representaba el 70% del tejido completamente pálida, sugiriendo la carencia casi total de dichas células (Figura 9B y 9F, flechas negras). Curiosamente, en la mayoría de los embriones la primera región se situaba en la porción más proximal a la placenta (Figura 9B) y sólo en un 25-30% de los casos, estos agregados de celulares se encontraban en otras localizaciones (Figura 9F).

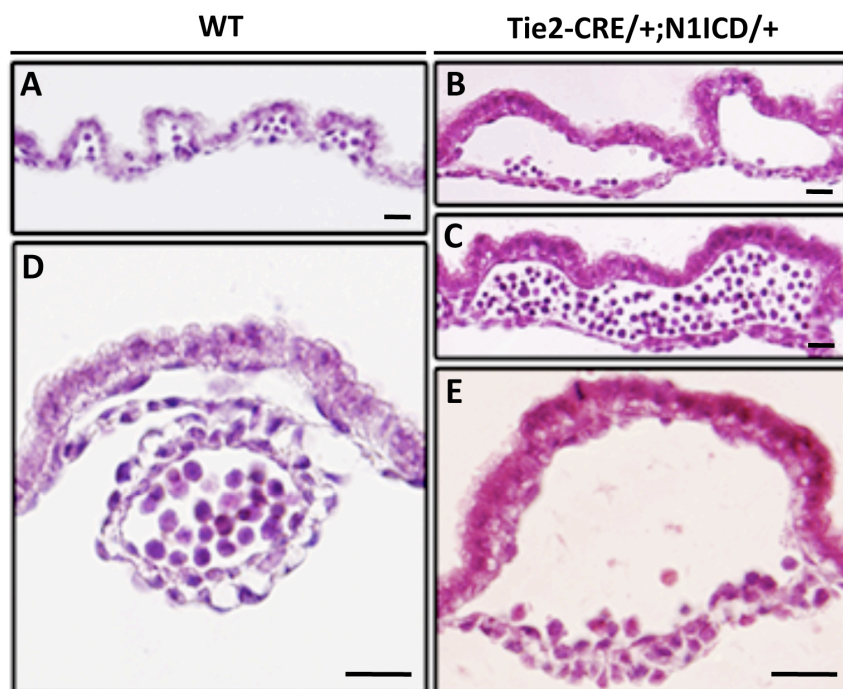
A su vez, el saco vitelino de los embriones transgénicos carecía de los vasos sanguíneos completamente desarrollados a estos estadios en embriones WT (Figura 9A-B, E-F), lo que sugería defectos en el remodelado de la red vascular en desarrollo. A E10-10.5, en el borde de la letalidad, observamos que estos rasgos fenotípicos eran mucho más acusados (Figura 9E-I).



**Figura 9.** Fenotipo de los embriones transgénicos *Tie2-CRE/+;N1ICD/+*. Imágenes de embriones WT (A, C, E, G) y *Tie2-CRE/+;N1ICD/+* (B, B', D, F, F', H, I) a E9.5 (A-D) y E10.5 (E-I). **A.** Embrión WT de E9.5 envuelto por el saco vitelino en el que se aprecian una red vascular desarrollada y llena de sangre hemoglobinizada (flechas). **B.** Aspecto del saco vitelino de un embrión *Tie2-CRE/+;N1ICD/+* de E9.5 en el que se distingue una red vascular poco desarrollada que posee una región completamente pálida (flechas negras) y otra con los vasos llenos de contenido hemoglobinizado (flechas amarillas). **B'.** Detalle ampliado de la zona enmarcada en B. **C-D.** Fenotipo de un embrión WT (C) y *Tie2-CRE/+;N1ICD/+* (D) de E9.5. Las flechas negras señalan la región de la AGM que es totalmente pálida en los embriones transgénicos, mientras que la amarilla indica el corazón y edema del pericardio en estos últimos. **E-F.** Embriones WT (E) y *Tie2-CRE/+;N1ICD/+* (F) de E10.5 envueltos del saco vitelino que muestra una carencia de la compleja red vascular desarrollada a estos estadios en los embriones transgénicos (flechas negras). Las flechas amarillas en F señalan una región del saco vitelino con agrupaciones de células hemoglobinizadas. **F'.** Detalle ampliado de la zona enmarcada en F. **G-I.** Fenotipo de un embrión WT (G) y *Tie2-CRE/+;N1ICD/+* (H, I) de E10.5. Las flechas en G indican la aorta dorsal en la región de la AGM, que en el embrión transgénico está completamente pálida. H e I corresponden a imágenes lateral y dorsal respectivamente, del mismo embrión *Tie2-CRE/+;N1ICD/+*. Las barras de escala corresponden a 800µm.



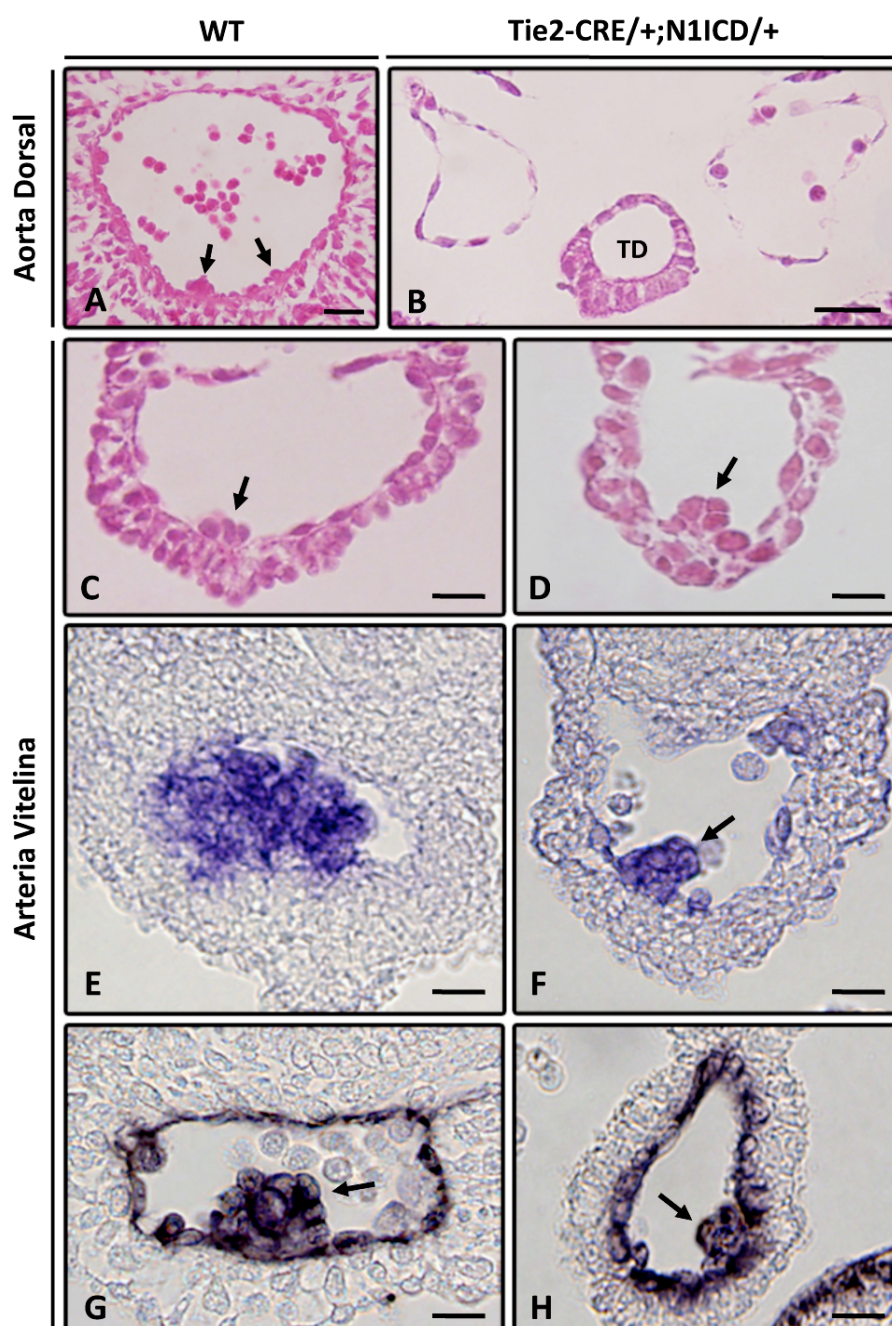
Tinciones histológicas convencionales de Hematoxilina y Eosina realizadas sobre secciones de saco vitelino WT y transgénico, pusieron de manifiesto una dilatación de los vasos sanguíneos de este tejido en los embriones transgénicos respecto a los WT (Figura 10A, E). De esta manera pudimos comprobar que la red vascular descrita anteriormente (Figura 9B, B', F, F') estaba compuesta de grandes vasos en forma de lagunas o cisternas. Este fenotipo podía deberse en parte a una reducción en el grosor de la pared quizá por un defecto en el desarrollo del músculo liso perivascular o en la maduración de los pericitos, que ejercen entre otras funciones la de soporte endotelial. De hecho, estudios recientes demuestran una implicación esencial de la vía de señalización Notch en la angiogenesis y el remodelado vascular (Hellström et al, 2007; Suchting et al, 2007).



**Figura 10.** Análisis histológico del saco vitelino de los embriones *Tie2-CRE/+;N1ICD/+*. Tinción de Hematoxilina y Eosina de secciones transversales del saco vitelino de embriones WT (paneles de la derecha) y *Tie2-CRE/+;N1ICD/+* (paneles de la izquierda) de E9.5. **A-C.** Imágenes a 200 aumentos de los islotes sanguíneos del saco vitelino WT (A) y transgénico (B y C) en la que se aprecia la diferencia en el diámetro vascular. En el saco vitelino transgénico se distinguen dos tipos de islotes: los primeros que representaban el 70%, con el espacio vascular prácticamente vacío (B), y los segundos con la cavidad llena de células circulantes (C). **D y E.** Detalle a 400 aumentos de un vaso sanguíneo WT bien desarrollado (D) y otro de un embrión *Tie2-CRE/+;N1ICD/+* dilatado y con una gran reducción de células circulantes, debido posiblemente a una exanguinación mayor como consecuencia de la dilatación vascular generalizada del saco vitelino (E). Las barras de escala corresponden a 25μm.

Por otro lado, en esta red pudimos distinguir dos tipos de islotes sanguíneos en los embriones *Tie2-CRE/+;N1ICD/+*: los primeros que representaban el 70% del total, con el lecho vascular prácticamente carente de células circulantes –principalmente de linaje eritroide– (Figura 10B), y un segundo grupo minoritario con el lumen lleno de ellas (Figura 10C). Este fenómeno podría ser secundario a una mayor exanguinación producida durante la disección y el procesamiento de los islotes de estos embriones debido a la dilatación vascular generalizada del saco vitelino. De hecho, al realizar la suspensión celular el saco vitelino total para analizar las poblaciones hematopoyéticas, podíamos recuperar números celulares muy similares entre WT y transgénico (datos no mostrados).

A su vez, la aorta dorsal, que a E9.5 ya se ha fusionado en la región ventral, en los embriones *Tie2*CRE/+;*N1ICD*/+ estaba presente de forma bilateral en todo su recorrido (Figura 11B). Además, al examinar la presencia de *clusters* hematopoyéticos en el endotelio de las grandes arterias intraembrionarias pudimos constatar su ausencia total en el endotelio ventral de las aortas dorsales, (Figura 11A, B) y en la arteria umbilical (dato no mostrado), aunque sí excepcionalmente –en el 10-20% de los embriones– en la vitelina (Figura 11C, D). Este resultado sugería un posible bloqueo en la generación, desarrollo y/o maduración de los progenitores hematopoyéticos intraembrionarios. De hecho, los escasos *clusters* que encontramos adheridos al endotelio ventral de la arteria vitelina en los embriones transgénicos eran de menor tamaño y estaban formados por células hematopoyéticas. La expresión del factor de transcripción *AML1/Runx1* demostró la identidad hematopoyética de los agregados celulares (Figura 11E, F). Estos resultados fueron corroborados por tinción de la integrina CD31 restringida no sólo a células hematopoyéticas sino también al endotelio (Figura 11G-H).



## Los embriones Tie2-CRE/+;N1ICD/+ presentan mosaicismo para los linajes hematopoyéticos derivados de progenitores Tie2<sup>+</sup>.

Para analizar los compartimentos hematopoyéticos a E9.5, preparamos suspensiones celulares tras la disección *ex vivo* del saco vitelino y la P-Sp/AGM, y la sangre recirculante procedente de la exanguinación de los embriones. Las muestras fueron sometidas a análisis cuantitativos de sus expresiones de proteínas de membrana por FACS y a purificación para estudios funcionales y de expresión genética.

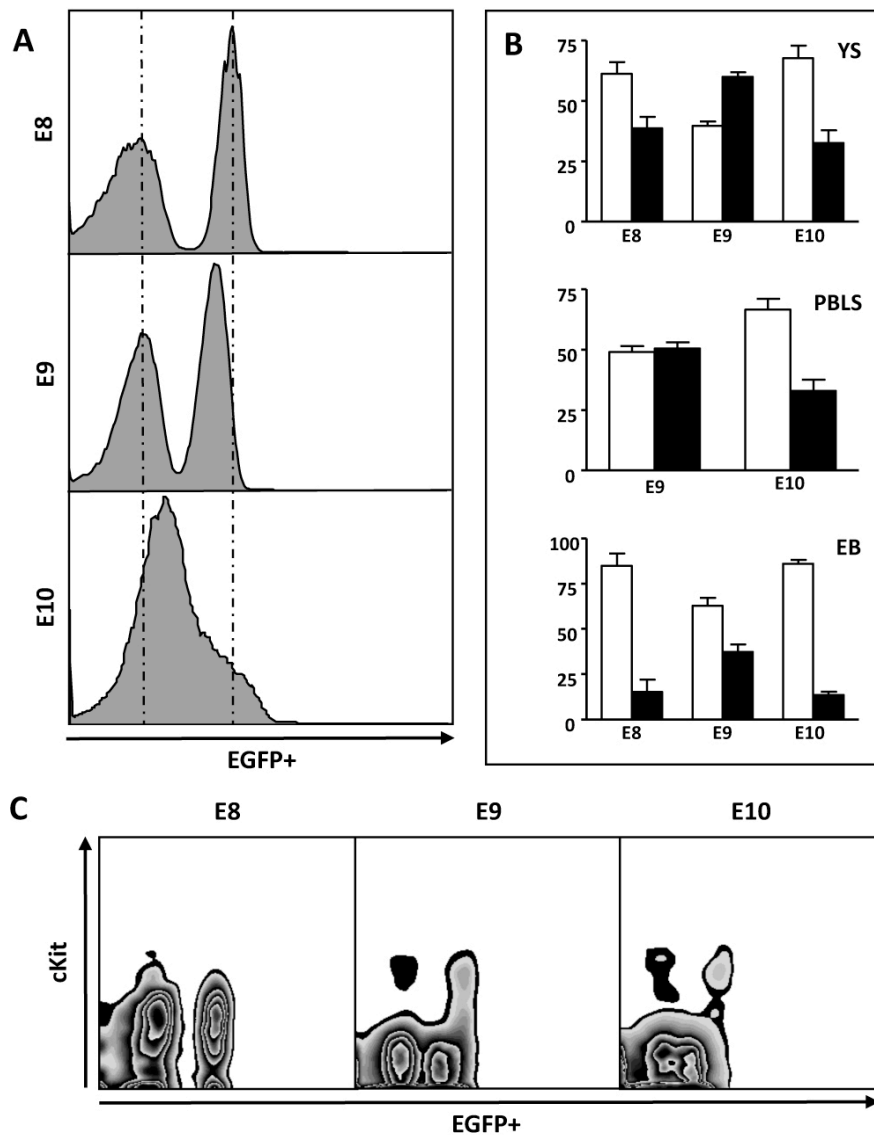
Como se muestra en la Figura 12A, una fracción importante de las células hematopoyéticas del saco vitelino de los embriones transgénicos no expresaban EGFP, lo que generaba una situación de *mosaicismo* en este tejido de células EGFP<sup>-</sup>/EGFP<sup>+</sup>. Por otro lado, pudimos determinar la existencia de un comportamiento de onda en la fracción celular N1ICD<sup>+</sup> (EGFP<sup>+</sup>). De esta manera, su presencia relativa aumentaba de E8.5 a E9.5 y se reducía a E10.5 (Figura 12B, YS). Estos datos fueron corroborados en las poblaciones celulares de la sangre circulante (PBLs) y del propio embrión (EB).

Además, Tie2 estaba presente en una fracción de los progenitores más inmaduros cKit<sup>+</sup> de la población EGFP<sup>-</sup> (Figura 17A, ver más adelante), sugiriendo que dicha población era consecuencia de una recombinación ineficiente del transgén y no de la existencia de una población embrionaria Tie2<sup>-</sup>. Esta situación de mosaicismo hematopoyético –que no ocurría en los linajes endoteliales (Figura 8C-E)– podría ser ventajosa para diseccionar los fenómenos intercelulares secundarios a la expresión de la vía de Notch.

Un fenómeno que observamos en el compartimento EGFP<sup>+</sup> del saco vitelino fue la desaparición selectiva de estas células principalmente entre E9 y E10 (Figura 12A y C). De hecho, a E8, podíamos distinguir claramente las dos poblaciones EGFP<sup>-</sup> y EGFP<sup>+</sup>, pero a medida que avanzaba el desarrollo la señal del EGFP iba desapareciendo para quedar prácticamente englobada en una única población a E10.

---

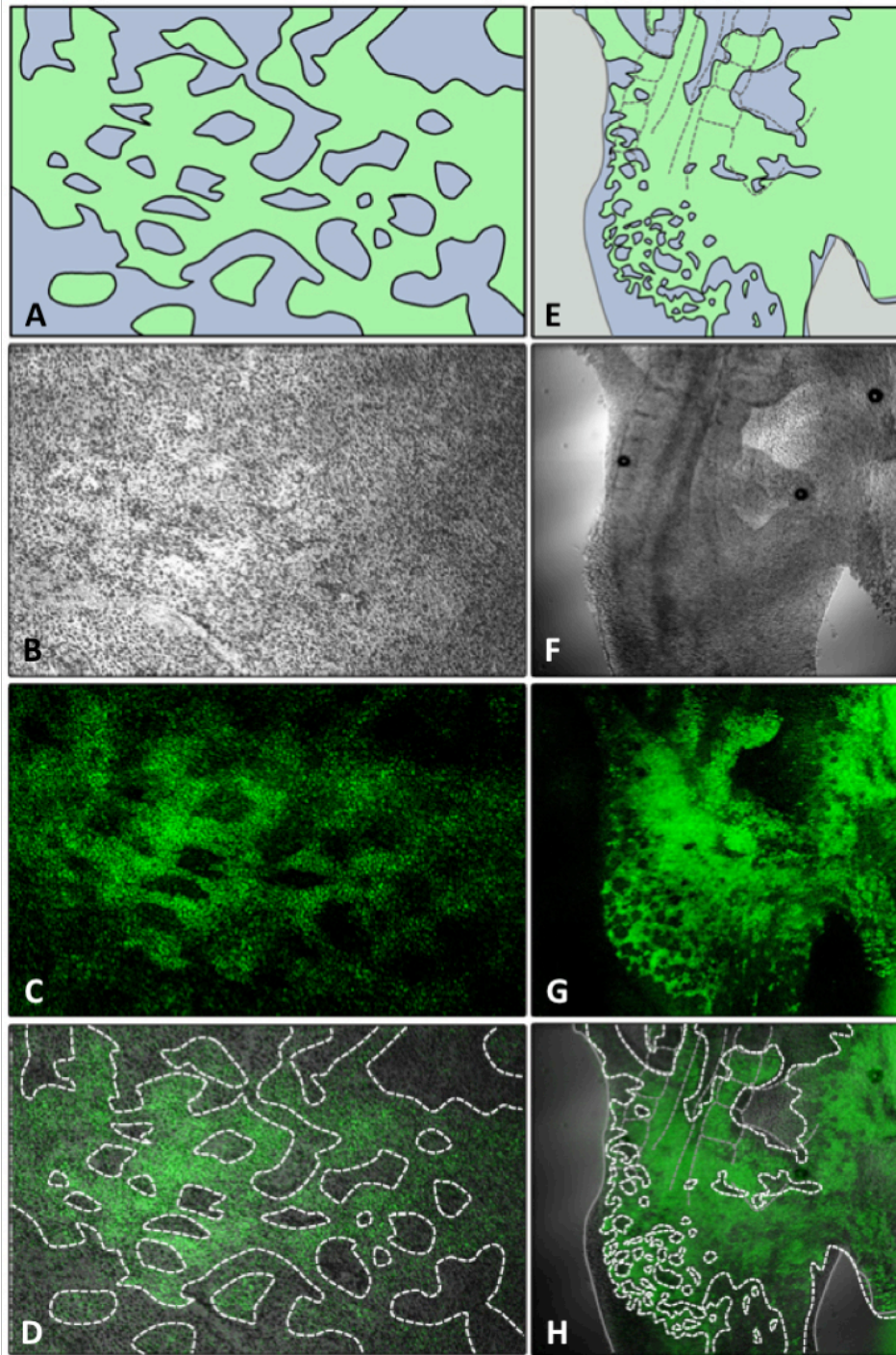
➔ **Figura 11.** Estudio histológico de las grandes arterias intraembrionarias en embriones Tie2-CRE/+;N1ICD/+. **A-D.** Tinción de Hematoxilina y Eosina de secciones transversales de embriones WT (paneles de la derecha) y Tie2-CRE/+;N1ICD/+ (paneles de la izquierda) de E9.5 en el que se muestran la aorta dorsal (A y B) y la arteria vitelina (C y D). **A y B.** Sección transversal de la aorta dorsal a la altura de la región de la AGM de un embrión WT (A) y transgénico (B). Las flechas en A indican la presencia de *clusters* hematopoyéticos adheridos a la pared ventral de la aorta WT. En los embriones Tie2-CRE/+;N1ICD/+ esta arteria es bilateral a lo largo de todo su recorrido y carece de dichos agregados celulares. **C y D.** Sección transversal de la arteria vitelina de un embrión WT (C) y transgénico (D). Las flechas indican la presencia de *clusters* hematopoyéticos en el endotelio ventral de las mismas. **E-F.** Sección transversal de la arteria vitelina WT (E) y transgénica (F) teñidas por hibridación *in situ* para detectar las células que expresan AML1/Runx1. La flecha en F indica la presencia de un *cluster* hematopoyético, que en el WT llega a obliterar prácticamente la luz del vaso. **G-H.** Inmunohistoquímica anti-CD31 (PECAM1) de secciones transversales de la arteria vitelina de embriones WT (G) y Tie2-CRE/+;N1ICD/+ (H) a E9.5. Las flechas señalan la presencia de *clusters* hematopoyéticos en el endotelio ventral. Las barras de escala corresponden a 25µm. TD: Tubo digestivo.



**Figura 12.** Evolución de la expresión de la EGFP en los embriones *Tie2-CRE/+;N1ICD/+*. **A.** Evolución de la expresión de la EGFP a lo largo de los tres estadios de desarrollo analizados por FACS: E8-E10. **B.** Cuantificación de los porcentajes de células EGFP<sup>-</sup> (barras blancas) y EGFP<sup>+</sup> (barras negras) en el saco vitelino (YS), la sangre recirculante (PBLs) y el propio embrión (EB) entre E8-E10. **C.** Marcaje de las células del saco vitelino de embriones transgénicos para detectar cKit y la EGFP. La mayor proporción de progenitores hematopoyéticos inmaduros (cKit<sup>+</sup>) proceden de células que contienen sobreactivada la vía Notch (EGFP<sup>+</sup>).

Para comprobar *in vivo* la sobre-expresión de N1ICD en los linajes hematovasculares, analizamos en el saco vitelino y en los vasos sanguíneos de la región más caudal del embrión la expresión del trazador EGFP (ver Figura 8A). Como se puede apreciar en la Figura 11, a E9.5 la EGFP estaba expresada tanto en la red vascular del saco vitelino (Figura 13A-D), como en la fina red capilar de la región más caudal de los embriones *Tie2CRE/+;N1ICD/+* (Figura 13E-H). Sin embargo, la intensidad de la EGFP expresada en el endotelio intraembrionario era mayor que en el saco vitelino. Este fenómeno podía deberse bien por un nivel de expresión menor en este último tejido o bien, como detallaremos más adelante, porque las poblaciones hematopoyéticas del saco vitelino derivadas de progenitores *Tie2*<sup>+</sup> presentaban mosaicismo. De hecho, el endotelio de los vasos intraembrionarios mostraba una expresión continua del gen *Tie2* (Figura 8C-E), mientras que ésta se perdía en algunas células circulantes presentes en el lumen (Figura 8C y D).

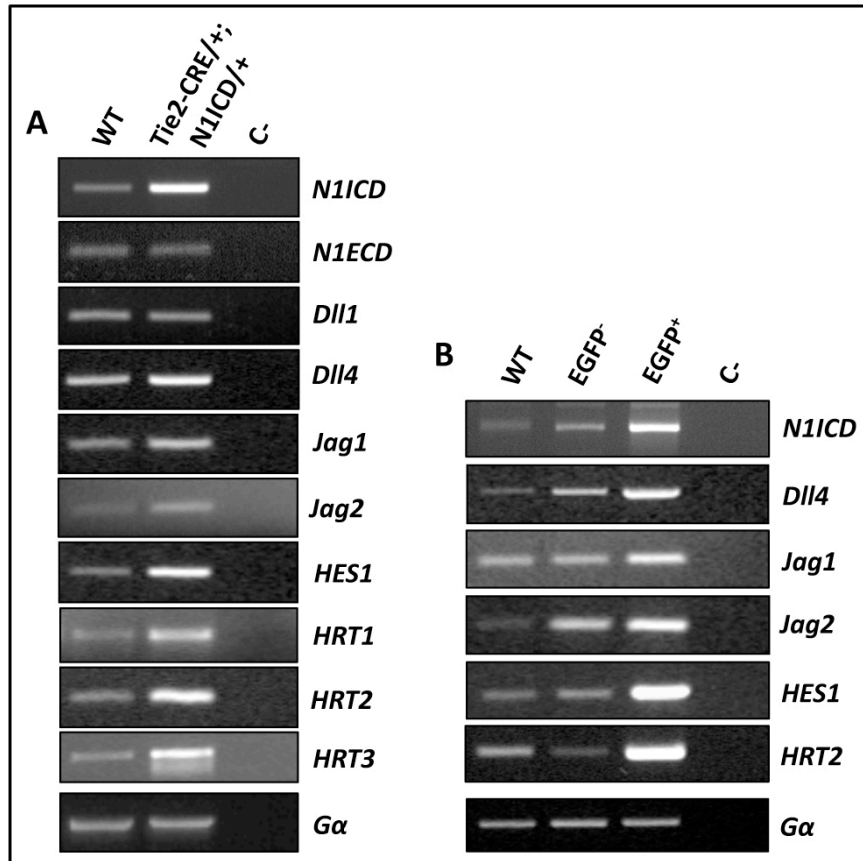




**Figura 13.** *Expresión de EGFP en la vasculatura del saco vitelino y del embrión.* **A.** Representación esquemática que detalla la expresión de EGFP (C, verde) del resto del tejido del saco vitelino (azul). **B-D.** Microscopía confocal del saco vitelino que muestra la vista en campo claro (B), la expresión de EGFP (C) y la superposición de ambas (D). Las líneas blancas discontinuas en D muestran las regiones delimitadas en A. **E.** Esquema que representa la parte más caudal del embrión. En verde se muestra la expresión de EGFP (G) y en azul el tejido embrionario negativo. Las líneas grises continuas resaltan los límites del embrión y las líneas grises discontinuas, dibujan algunas estructuras internas como los últimos pares de somitos. **F-H.** Imágenes de microscopía confocal en campo claro (F), con la expresión de EGFP (G) y la superposición de ambas (H) de la región más caudal del embrión, donde se aprecia la fina red capilar que expresa EGFP. Las líneas blancas discontinuas en H bordean esta red vascular.

**La expresión de N1ICD en progenitores Tie2<sup>+</sup> resulta en una sobre-activación generalizada de la vía y una marcada ausencia de hematopoyesis intraembrionaria.**

Analizamos el efecto de la sobre-expresión de N1ICD sobre los componentes de la vía de señalización Notch más importantes durante el desarrollo vascular y hematopoyético en el saco vitelino total WT y Tie2-CRE/+;N1ICD/+ (Figura 14A) y en células WT, EGFP<sup>-</sup> y EGFP<sup>+</sup> purificadas de este tejido (Figura 14B). Como era de esperar, la expresión del dominio intracelular del receptor Notch1 estaba significativamente elevada en el saco vitelino de los transgénicos y en particular, en las células EGFP<sup>+</sup>, mientras que el nivel de Notch1 endógeno (definido por la transcripción del dominio extracelular, N1ECD) no cambiaba.



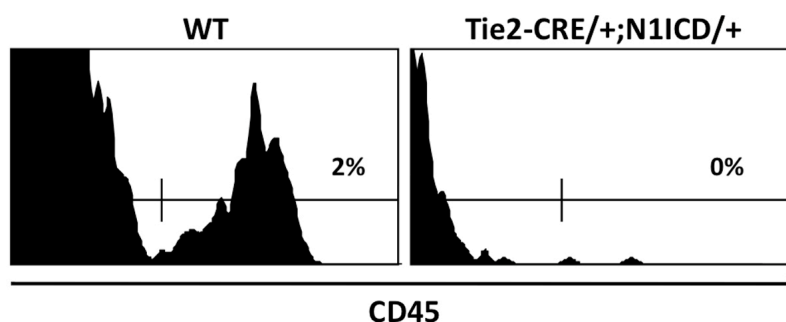
**Figura 14.** Expresión de los componentes de la vía de señalización Notch en el saco vitelino embrionario. **A.** Análisis por RT-PCR semicuantitativa de la actividad transcripcional de los componentes de la vía Notch más importantes en el desarrollo hematovascular temprano sobre extractos de saco vitelino total de embriones WT y Tie2-CRE/+;N1ICD/+. **B.** Análisis por RT-PCR semicuantitativa de la expresión de algunos de los componentes de la vía de señalización Notch en las células WT y las poblaciones transgénicas EGFP<sup>-</sup> y EGFP<sup>+</sup> purificadas. C-: control negativo (H<sub>2</sub>O).

Tanto en extractos totales de saco vitelino de los embriones Tie2-CRE/+;N1ICD/+, como en su fracción EGFP<sup>+</sup> purificada –por tanto, N1ICD<sup>+</sup> (ver Figura 8A)–, los transcritos correspondientes a los ligandos Dll4, Jag1 y Jag2 estaban incrementados, mientras que la expresión de Dll1 era marginal en el saco vitelino y no variaba en los transgénicos. Por otro lado, todos los factores de transcripción definidos como dianas clásicas de Notch que analizamos (Hes1, HRT2, a nivel cuantitativo y HRT1, HRT3, por RT-PCR semicuantitativa) estaban incrementados en el tejido total y Hes1 y HRT2 muy elevados en las células EGFP<sup>+</sup> purificadas con respecto a las WT.

Es interesante reseñar que la fracción hematopoyética  $EGFP^-$  de los embriones transgénicos difería de la población WT. Como se muestra en la Figura 10B, la transcripción de *N1ICD* estaba moderadamente incrementada en ella, así como la expresión de los ligandos *Dll4* y *Jag2*. Sin embargo y paradójicamente, la transcripción de *HRT2* estaba sistemática disminuida con relación a las células WT.

Por tanto, pudimos concluir que la activación constitutiva Notch promovía la expresión incrementada de la mayoría de los ligandos complementarios, así como la de sus dianas clásicas de una manera autónoma celular (en las células  $EGFP^+$ ). A su vez, era capaz de inducir la activación transcripcional de los ligandos analizados –a excepción de *Jag1*– en las demás células ( $EGFP^-$ ) del propio sistema hematopoyético en el saco vitelino transgénico.

Por otro lado, el receptor de angiopoyetina *Tie2*/TEK es una de las primeras moléculas expresadas en los progenitores hematovasculares más tempranos (ya sean hemangioblastos embrionarios o su correlato en células ES, las BL-CFCs). Como hemos descrito en el apartado de *Materiales y Métodos*, el modelo genético que abordamos implicaba que todas las células del embrión que expresasen *Tie2* en algún momento de la vida y sus derivados tendrían la vía de Notch constitutivamente activada y podrían ser trazadas con *EGFP* –lo que valdría tanto para los linajes endoteliales como para las células hematopoyéticas embrionarias–.



**Figura 15.** La hematopoyesis definitiva está completamente bloqueada en los embriones *Tie2-CRE/+;N1ICD/+*. Análisis de la expresión del marcador de membrana común a todos los linajes hematopoyéticos CD45, en la región intraembrionaria de la P-Sp/AGM a E9.5 en embriones WT y *Tie2-CRE/+;N1ICD/+*. Como se puede apreciar, la generación de células hematopoyéticas en esta región se encuentra totalmente bloqueada en los embriones transgénicos.

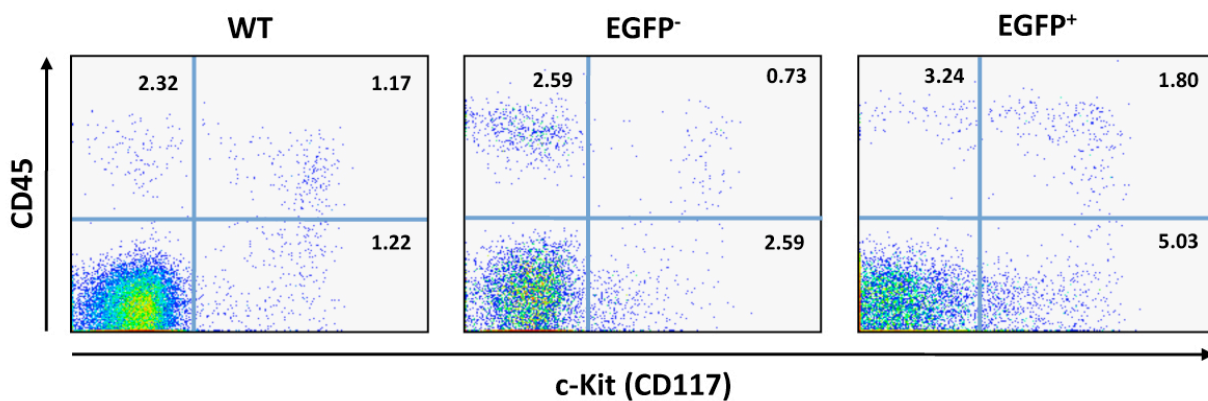
De acuerdo con los estudios *in situ*, cabe destacar que, mientras la celularidad del saco vitelino y de la sangre recirculante no difería significativamente entre embriones transgénicos y WT (datos no mostrados), existía una marcada ausencia de células hematopoyéticas  $CD45^+$  recuperadas de la P-Sp/AGM del embrión (Figura 15). Este resultado sugería que la hematopoyesis intraembrionaria se encontraba bloqueada desde los primeros estadios de desarrollo, puesto que la fracción de células hematopoyéticas que pudimos detectar en estos tejidos fue marginal.

### Activación constitutiva de Notch: Frecuencias de progenitores multipotenciales/HSCs embrionarias.

La expresión del receptor tirosina-quinasa *cKit* define progenitores inmaduros de múltiples linajes celulares, pero en el saco vitelino y en la sangre recirculante del embrión, se restringe a células hematopoyéticas. Cuando analizamos esta población en las células  $EGFP^-$  y  $EGFP^+$ , ambas incluían células  $cKit^+$ , pero sus números estaban relativamente incrementados en el

caso de las células  $N1ICD^+$ , con respecto a las  $N1ICD^-$  y WT (Figura 12C). Por otra parte, mientras en las  $N1ICD^-$  y WT, estos progenitores mantenían niveles altos del receptor, las células  $N1ICD^+$  contenían subpoblaciones tanto  $cKit^{high}$ , como  $cKit^{low}$  constituyendo estas últimas probablemente un componente más diferenciado (Figura 12C, E9-E10).

A su vez, el doble marcaje  $cKit/CD45$  revela una secuencia lineal de poblaciones  $cKit^+CD45^-$ ,  $cKit^+CD45^+$  y  $cKit^-CD45^+$ , de más inmadura a más madura donde el componente fundamental de ese compartimento  $CD45^+$  embrionario es mieloide (Bertrand et al, 2005a). Cuando realizamos estos marcajes en células WT,  $EGFP^-$  y  $EGFP^+$  purificadas, la fracción  $cKit^+$  se distribuía entre células  $CD45^+$  y  $CD45^-$  tanto en embriones WT, como en transgénicos (Figura 16). De hecho, la mayor diferencia se situaba en las más inmaduras,  $cKit^+CD45^-$ , que se encontraban muy aumentadas en la fracción  $EGFP^-$ . Este dato indicaba que la expresión constitutiva de Notch desde estadios tempranos de la ontogénesis hematovascular expandía esta población de progenitores inmaduros.



**Figura 16.** Efecto de la sobre-activación de la vía Notch sobre el desarrollo mieloide temprano. El doble marcaje  $cKit/CD45$  revela una secuencia lineal de poblaciones mieloides en desarrollo a E9.5. La población  $cKit^+CD45^-$  se mostró incrementada en el compartimento  $EGFP^+$ , mientras que las  $EGFP^-$  experimentó un aumento menor respecto de las células WT. Asimismo, observamos una promoción hacia los estadios más diferenciados de la maduración mieloide (células  $cKit^+CD45^+$ ) en las células  $N1ICD^+$ .

A su vez, las células  $cKit^+CD45^+$  estaban igualmente aumentadas en el compartimento  $EGFP^+$  (Figura 16), lo que sugería una mayor promoción hacia linaje mieloide al sobre-activar constitutivamente Notch, como detallaremos más adelante. Además, sorprendentemente, la frecuencia de estos precursores  $cKit^+CD45^-$  y de las células  $cKit^+CD45^+$  del compartimento  $N1ICD^-$  de los transgénico mostraban un incremento, aunque menor, que el observado para el  $N1ICD^+$  (Figura 16). Este resultado sugería la existencia de algún tipo de señalización intercelular entre los compartimentos  $N1ICD^+$  y  $N1ICD^-$  del saco vitelino transgénico.

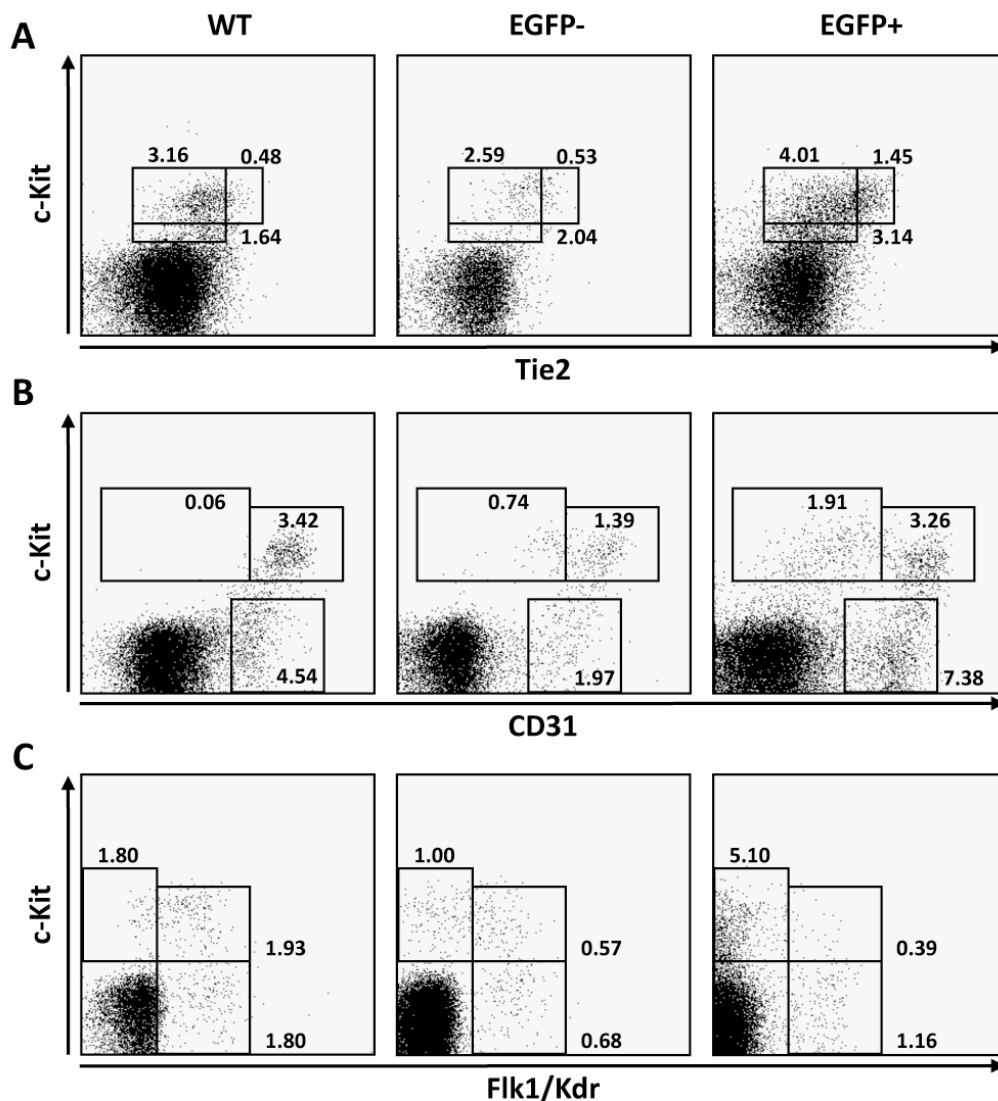
Por otro lado, la expresión de *Tie2* en progenitores hematopoyéticos embrionarios nos sirvió para incrementar el grado de enriquecimiento en células madre con potencial de autorrenovación y/o hemangioblastos bipotenciales. De esta manera, la tinción doble  $cKit/Tie2$  reveló la existencia de tres poblaciones discretas: (1)  $cKit^{high}Tie2^{high}$ , (2)  $cKit^{high}Tie2^{low/-}$ , y (3)  $cKit^{low}Tie2^-$ —de más inmaduras a más madura—.

Como se observa en la Figura 17A, la primera población estaba selectivamente muy incrementada en las células  $N1ICD^+$  comparada con las  $N1ICD^-$  y las WT. Sorprendentemente, como ya hemos descrito, el porcentaje de células  $cKit^{high}Tie2^{high}$  en el compartimento  $EGFP^-$  era similar al WT, lo que indicaba la presencia de células  $Tie2^+$  en esta fracción celular que sugería una



eficiencia parcial de la recombinasa CRE, resultando en una situación de mosaicismo. Por otro lado, las células  $\text{cKit}^{\text{high}}\text{Tie2}^{\text{low/-}}$  se encontraban a su vez aumentadas en las  $\text{N1ICD}^+$  respecto a las WT. De nuevo, los precursores más avanzados,  $\text{cKit}^{\text{low}}\text{Tie2}^-$ , predominaban en las células  $\text{EGFP}^+$ . Estos datos indicaban que la activación constitutiva de Notch en las células  $\text{Tie2}^+$  expandiría la población de los progenitores más inmaduros  $\text{cKit}^+\text{Tie2}^+$ , además de favorecer la diferenciación a estadios posteriores de maduración  $\text{cKit}^{\text{low}}\text{Tie2}^-$ .

Marcajes de  $\text{cKit}/\text{CD31}$  (Figura 17B) y  $\text{cKit}/\text{Kdr}$  (Figura 17C), mostraron resultados similares: incremento de los progenitores inmaduros  $\text{cKit}^+\text{CD31}^-$  y  $\text{cKit}^+\text{Kdr}^-$ , respectivamente. Es importante reseñar que la disminución de células  $\text{Kdr}^+$  en el saco vitelino transgénico era presumiblemente debido a una inhibición transcripcional de este gen como consecuencia de la activación constitutiva de Notch. De hecho, la relación entre células  $\text{cKit}^+\text{Kdr}^-/\text{cKit}^+\text{Kdr}^+$ , variaba de 1/1 en la población WT vs. 1/3 en  $\text{EGFP}^-$  y 1/10 en  $\text{EGFP}^+$ .



**Figura 17.** La población de progenitores hematopoyéticos inmaduros se encuentra expandida en el compartimento  $\text{EGFP}^+$  del saco vitelino. **A.** Marcaje de  $\text{cKit}/\text{Tie2}$ : la población  $\text{cKit}^+\text{Tie2}^-$  se encuentra incrementada en las células que sobre-expresan  $\text{N1ICD}$ . **B.** Doble marcaje  $\text{cKit}/\text{CD31}$ , en el que se puede apreciar un aumento en la población  $\text{cKit}^+\text{CD31}^-$  en el compartimento  $\text{EGFP}^+$ . **C.** En el marcaje  $\text{cKit}/\text{Kdr}$  se observa de nuevo el aumento de la población de progenitores inmaduros, en este caso  $\text{cKit}^+\text{Kdr}^-$  en las células  $\text{N1ICD}^+$ .

De esta manera, observamos que existían dos fenómenos: una expansión de la población de los progenitores más inmaduros acompañado de una rápida promoción a estadios intermedios de maduración compuestos de progenitores multipotenciales.

### **Alteraciones funcionales de progenitores hematopoyéticos N1ICD<sup>+</sup>.**

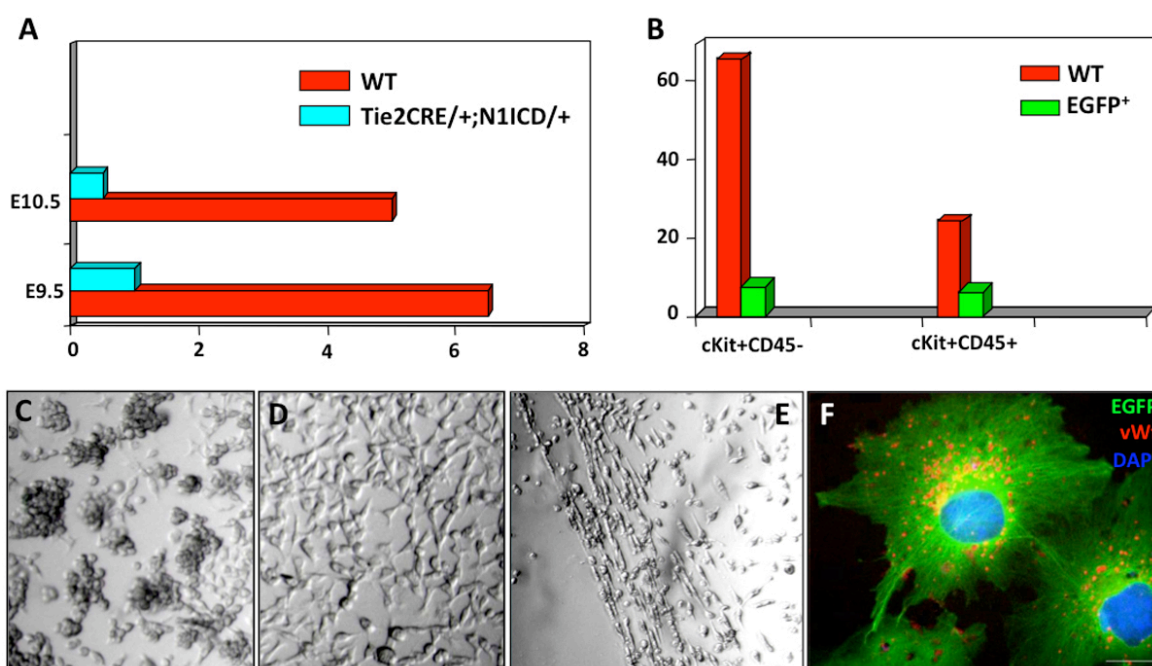
Como hemos descrito en la *Introducción*, las HSCs se caracterizan por su potencial de autorrenovación evaluado por la capacidad de reconstitución a largo plazo o de regeneración hematopoyética de receptores secundarios. Esta definición no puede aplicarse a estadios embrionarios tempranos anteriores a E10.5 (salvo en reconstituciones de neonatos mielosuprimidos, puesto que no reconstituyen tejidos adultos). Como alternativa, un protocolo bien validado para estudiar el potencial hematopoyético de dichos progenitores son los cultivos clonales *in vitro* en medios semisólidos (CFU-C, ver *Introducción*).

Cuando analizamos células totales de saco vitelino, sangre o P-Sp de embriones WT y Tie2-CRE/+;N1ICD/+, tanto a E9.5 como a E10.5, observamos una dramática reducción de las frecuencias de CFUs, tanto eritroides, como eritromieloides y multilineage en los tejidos transgénicos (Figura 18A). Menos marcada fue la reducción de pequeñas colonias rojas y compactas que emergían temprano en los cultivos y que correspondían a CFUs de la eritropoyesis primitiva (datos no mostrados). Al purificar células N1ICD<sup>+</sup> del saco vitelino transgénico, la reducción en CFUs se debía principalmente a los progenitores inmaduros cKit<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup> y no tanto a las células hematopoyéticas cKit<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> que emprendían el camino de la diferenciación (Figura 18B). Este resultado indicaba que, a pesar de la expansión observada en la población de progenitores hematopoyéticos inmaduros (Figura 17), éstos se encontraban funcionalmente alterados de una manera autónoma celular a la activación constitutiva de Notch (en células EGFP<sup>+</sup>).

Cabía la posibilidad de que estas deficiencias fueran el resultado de un número menor de progenitores, aunque los análisis cuantitativos descritos en el párrafo anterior no parecían apoyarlo. Purificamos adicionalmente progenitores cKit<sup>+</sup>, cKit<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup> (Figura 18B) y cKit<sup>+</sup>Tie2<sup>+</sup> de las poblaciones celulares WT, N1ICD<sup>-</sup> y N1ICD<sup>+</sup> a E9.5-10.5. Sembramos números equivalentes de células en los cultivos en titulación y la frecuencia de aparición de CFUs fue contabilizada a lo largo de dos semanas de cultivo. La eficiencia clonal de los cultivos de células cKit<sup>+</sup>Tie2<sup>+</sup> alcanzó 1 colonia cada 1,5-2 células sembradas (datos no mostrados). Sin embargo, en todos estos casos, el potencial hematopoyético de los progenitores N1ICD<sup>+</sup> no alcanzó más allá de 1/10 de los equivalentes de embriones WT, demostrando, de nuevo, un defecto autónomo celular secundario a la activación constitutiva de Notch en estos progenitores.

Una característica inesperada y exclusiva de las pocas colonias generadas a partir de progenitores N1ICD<sup>+</sup> fue la presencia de un nuevo tipo de célula polarizada, de morfología semejante a células endoteliales (Figura 18D), junto al resto de componentes celulares redondeados, eritroides, mieloides o de megacariocitos (Figura 18C). Este componente celular tendía a disponerse en la periferia de las colonias y se conectaba con células equivalentes por sus extremos polares hasta conformar una típica red celular entre cuyos espacios intermedios se incluían agregados celulares hematopoyéticos. Esta organización celular era similar a la de las redes vasculares primitivas que inician la angiogénesis. De hecho, cuando las transferimos a condiciones específicas de diferenciación vascular desarrollaban estructuras pseudo-tubulares (Figura 18E). Estas células N1ICD<sup>+</sup> eran Ter119<sup>-</sup>CD45<sup>-</sup>, y eran capaces de internalizar el factor de von Willebrand (vWF, Figura 18F), típico de células endoteliales maduras. Por el carácter clonal de estos estudios *in vitro*, debíamos concluir que la activación constitutiva de Notch, a la vez que inhibía el potencial hematopoyético de progenitores inmaduros, promovía (y/o rescataba) el

desarrollo vascular de los mismos –incluso en condiciones no específicamente establecidas para dicho desarrollo, y en particular, en ausencia de VEGF–. Este efecto era de nuevo autónomo celular secundario a la sobre-activación de la vía.



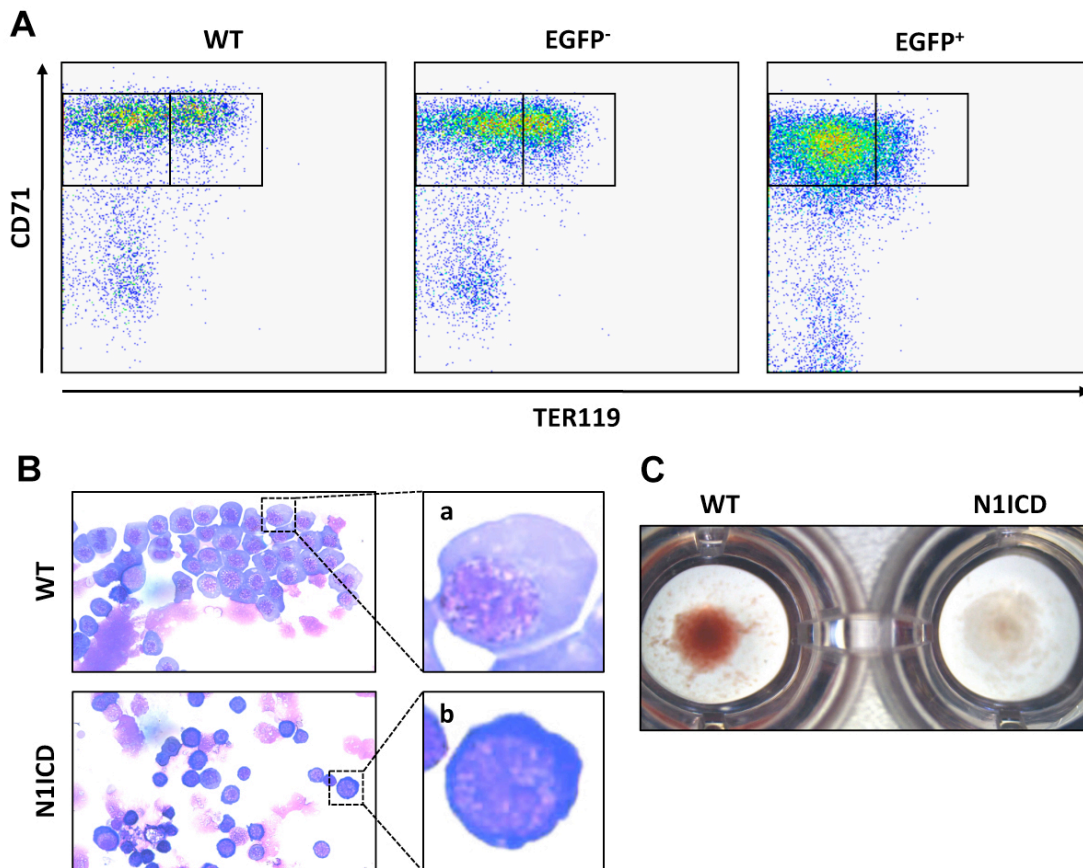
**Figura 18.** La sobre-expresión de N1ICD en progenitores  $Tie2^+$  conduce a una alteración funcional de los progenitores hematopoyéticos. **A.** Resultados de un CFU-C con células procedentes del saco vitelino total WT (barras rojas) y Tie2-CRE/+N1ICD/+ (barras azules) a E9.5 y E10.5. **B.** CFU-C de las poblaciones cKit+CD45- y cKit+CD45+ a partir de células WT (barras rojas) y EGFP+ (barras verdes) purificadas del saco vitelino a E9.5. **C y D.** Morfología de las colonias generadas a partir de las células EGFP+ en las que se pueden distinguir un componente central formado por células hematopoyéticas redondeadas (C) y en la periferia un tipo celular con una forma tipo fibroblasto (D). **E.** Cultivo de las células mostradas en D sobre una matriz de fibronectina. Como se puede observar, las células eran capaces de ordenarse formando estructuras pseudotubulares. **F.** Tinción de las células mostradas en D y E que demuestra la expresión de EGFP (verde) y la capacidad de incorporar el factor de Von Willebrand (vWf, en rojo), característica ésta última exclusiva de células endoteliales.

Dichas colonias vasculohematopoyéticas emergían de progenitores  $N1ICD^+cKit^+CD45^-$ , pero nunca a partir de células  $CD45^+$  (datos no mostrados), de manera que no era debido a la inducción de algún proceso de “transdiferenciación” de células hematopoyéticas a vasculares. Más bien, era secundario a la promoción de desarrollo endotelial en progenitores muy inmaduros, dotados aún de plasticidad y capaces de responder y ser modulados por Notch.

### Bloqueo parcial de la diferenciación eritroide en los embriones Tie2-CRE/+;N1ICD/+.

Mientras los progenitores multipotenciales anteriormente descritos posiblemente corresponden sobre todo a la onda de hematopoyesis definitiva, los precursores linaje-específicos a E9.5-10.5 son, en su mayoría, derivados de progenitores primitivos. La diferenciación eritroide se caracteriza por una sucesión de estadios que pueden ser singularizados con un doble marcaje del receptor de transferrina CD71 y el receptor tirosina-quinasa Ter119 (Asari et al, 2005; Socolovsky et al, 2001).

La Figura 19A muestra que el compartimento celular  $N1ICD^+$  presentaba una reducción significativa a E9.5 de los precursores  $CD71^{high}Ter119^{+/high}$ , mientras los precursores más inmaduros  $CD71^+Ter119^-$  y  $CD71^{high}Ter119^{+/low}$  estaban relativamente expandidos. De hecho, estos precursores se encontraban bloqueados en el estadio de maduración de proeritroblasto (Asari et al, 2005; Socolovsky et al, 2001). Estos resultados fueron confirmados con la tinción de May Grunwald-Giemsa en extensiones de células procedentes de saco vitelino WT y transgénico. Como se puede observar en el Figura 19B, las células de los embriones  $Tie2-Cre/+;N1ICD/+$  eran de menor tamaño, presentando una relación núcleo/citoplasma mayor y una tinción más oscura del citoplasma. Estos rasgos fenotípicos eran indicativos de una mayor inmadurez.

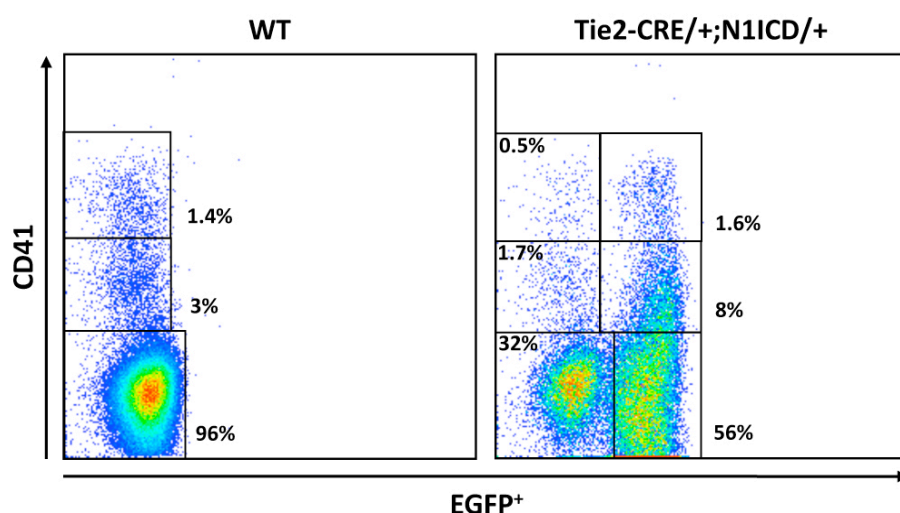


**Figura 19.** *Notch y el desarrollo eritroide temprano.* **A.** Marcaje CD71/TER119 en el que se puede observar un bloqueo parcial en el estadio de proeritroblasto de los precursores eritroide procedentes de células  $EGFP^+$  del saco vitelino a E9.5. **B.** Tinción de May Grunwald-Giemsa de extensiones celulares procedentes de saco vitelino WT y  $Tie2-CRE/+;N1ICD/+$ . Los paneles de la derecha muestran un detalle de dos células típicas de ambos genotipos. **C.** Aspecto de las suspensiones celulares del saco vitelino WT y transgénico una vez centrifugados.

Estos datos estaban en consonancia con el aspecto pálido que mostraba en saco vitelino de los embriones transgénicos (Figura 9B y F). De hecho, al centrifugar la suspensión celular procedentes de este tejido de embriones WT y  $Tie2-CRE/+;N1ICD/+$ , pudimos observar claramente la carencia de contenido en hemoglobina en los extractos transgénicos (Figura 19C). En su conjunto, pudimos concluir que la activación constitutiva de Notch conducía a un bloqueo parcial de la eritropoyesis primitiva en el estadio de proeritroblasto.

Observamos un bloqueo más moderado de la diferenciación eritroide en células N1ICD<sup>-</sup>. Esto podría deberse a (1) señales intercelulares directamente relacionadas con la activación constitutiva de Notch en células adyacentes y/o a (2) procesos de inhibición de diferenciación en respuesta a señalizaciones procedentes de células eritroides inmaduras en situaciones de mosaicismo genético, a través de factores solubles producidos por eritrocitos y aún no bien caracterizados (Whyatt et al, 2000).

A diferencia del linaje eritroide, la diferenciación megacariocítica parecía estar preservada (y/o modestamente incrementada) en los embriones transgénicos y células N1ICD<sup>+</sup>. La integrina CD41 define la población de megacarioblastos/megacariocitos, aunque también la expresan los primeros progenitores hematopoyéticos. Marcajes con CD41 revelaron la presencia de una población normal o levemente expandida de células CD41<sup>high</sup> en el compartimiento N1ICD<sup>+</sup> (EGFP<sup>+</sup>, Figura 20) compatible con el linaje megacariocítico. Estos datos sugerían que, a pesar de la presunta existencia de un progenitor común megacariocito-eritrocito, la activación constitutiva de Notch actuaría en dicha ramificación inhibiendo parcialmente la diferenciación eritroide –no su especificación inicial– mientras que no influiría significativamente o incluso promocionaría ligeramente el desarrollo de los megacariocitos.



**Figura 20.** La población de megacariocitos se encuentra preservada en el saco vitelino de los embriones transgénicos. La población CD41<sup>high</sup> experimenta un ligero aumento en las células que sobre-expresan N1ICD. Las células CD41<sup>low</sup>, que muestran un incremento de tres veces en el embrión transgénico respecto al WT, corresponden a E9.5 principalmente al compartimento mieloide (Figura 16 y 21).

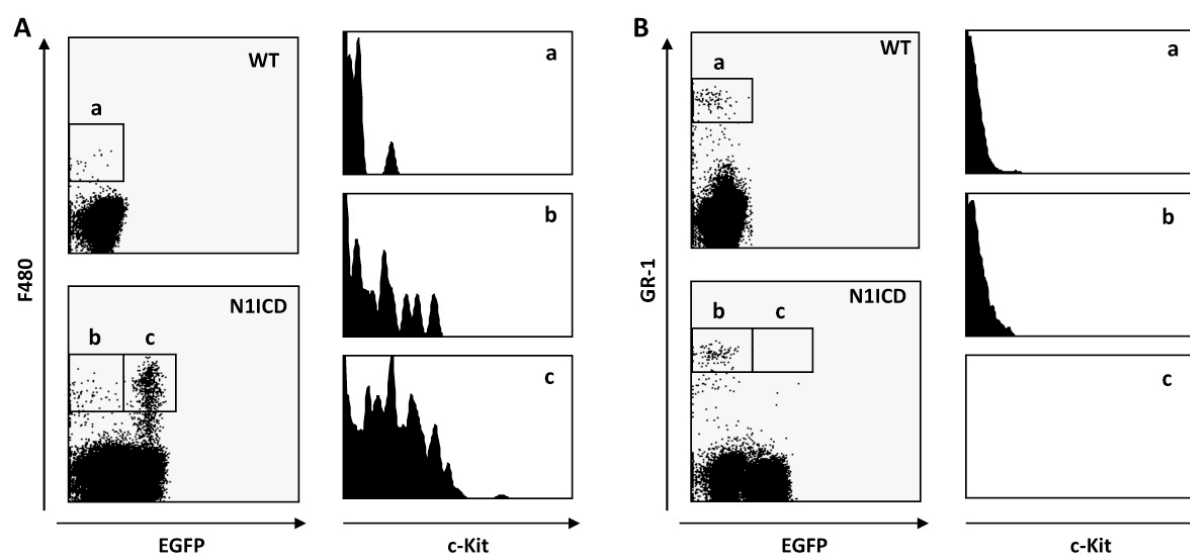
## Notch y la mielopoyesis embrionaria.

Actualmente se considera que en el saco vitelino temprano se produce una onda primitiva de mielocitos, probablemente a partir de progenitores mieloeritroides que emergen antes que las HSCs de la P-Sp intraembrionaria. Por otra parte, en diferentes contextos, la actividad de la vía de Notch ha sido implicada tanto en promoción como en bloqueo de la mielopoyesis (Bigas et al, 1998; de Pooter et al, 2006; Kumano et al, 2001; Milner et al, 1996; Schroeder & Just, 2000; Tan-Pertel et al, 2000), por lo que su estudio en nuestro modelo experimental podía aportar evidencias clarificadoras al respecto.

Como se muestra en la Figura 16, las frecuencias de células CD45<sup>+</sup> (distribuidas entre inmaduras cKit<sup>+</sup> y maduras cKit<sup>-</sup>) dentro del compartimiento N1ICD<sup>+</sup> duplicaba dichas frecuencias

para las células WT y N1ICD<sup>-</sup> -5.04% (3.24%+1.8%) vs. 3.49% y 3.32%, respectivamente-. Además, el nivel de expresión de CD45 en las EGFP<sup>+</sup> era moderadamente más elevado.

Por otro lado y trazando las expresiones de receptores asociados a monocitos/granulocitos (CD11b/Mac1, F4/80, GR-1) junto a CD45 y cKit, exploramos las poblaciones mieloides *in vivo* (Figura 21). Cuando analizamos la expresión del antígeno F4/80 -presente a lo largo de todos los estadios de maduración mieloide-, el patrón recapitulaba el descrito para CD45: un aumento de células F4/80<sup>+</sup> en el compartimento N1ICD<sup>+</sup> respecto a las N1ICD<sup>-</sup> y WT (Figura 21A). A diferencia de las dos últimas -F4/80<sup>high</sup>cKit<sup>-</sup>, en su mayoría (Figura 21A, a y b)-, las presentes en la población N1ICD<sup>+</sup> contenían tanto células con un nivel bajo del antígeno, como alto. Dichos niveles se correspondían con la presencia y ausencia del receptor cKit, respectivamente (Figura 21A, c). A su vez, la expresión de la integrina CD11b/Mac-1 confirmó los resultados obtenidos con F4/80 (datos no mostrados).



**Figura 21.** Efecto de la sobreactivación de la vía Notch sobre la diferenciación mieloide. **A.** Marcaje de las células WT, EGFP<sup>-</sup> y EGFP<sup>+</sup> purificadas para detectar F4/80 (paneles de la izquierda) y c-Kit (*forward scattered*, paneles de la derecha). Observamos un nítido aumento de las poblaciones mieloide en el compartimento EGFP<sup>+</sup>, que contenía tanto células cKit<sup>+</sup> como cKit<sup>-</sup>. **B.** El marcaje del antígeno propio de granulocitos, GR-1 que puso de manifiesto la ausencia completa de esta fracción celular en la población que N1ICD<sup>+</sup>.

Sin embargo, cuando teñimos las células del saco vitelino y de la sangre para detectar GR-1 (marcador de granulocitos maduros) y cKit, observamos la presencia de una nítida población de células GR-1<sup>+</sup>cKit<sup>-</sup> en WT y N1ICD<sup>-</sup> (Figura 21B, a y b) pero su completa ausencia en las EGFP<sup>+</sup> (Figura 21A, c). Este dato implicaba un bloqueo selectivo en la diferenciación a granulocitos primitivos como consecuencia de la activación constitutiva de la vía Notch.

Recientemente, se ha descrito que esta población GR-1<sup>+</sup>cKit<sup>-</sup> podría corresponder a una onda de diferenciación mieloide cuya ventana temporal durante la embriogénesis sería anterior a los estadios que nosotros analizamos, con lo que a E9.5 estaría aparentemente ya concluida (Bertrand et al, 2005b). Alternativamente, también podrían ser de origen materno y constituir una población contaminante en este experimento. No obstante, el hecho de que este mismo bloqueo pudimos reproducirlo en condiciones promieloides de cultivos estromales establecidos con progenitores EGFP<sup>+</sup> y EGFP<sup>-</sup> (datos no mostrados), sugería que esta población GR-1<sup>+</sup>cKit<sup>-</sup> procedía realmente del embrión.



Para descartar completamente la posibilidad de que las células GR-1<sup>+</sup> de los compartimentos celulares WT y EGFP<sup>-</sup> fuesen de origen materno, cruzamos hembras Ly5.2 con machos Ly5.1, de los que recuperamos embriones a E9.5. La expresión de la isoforma Ly5.1 en una fracción de la población GR-1<sup>+</sup> de dichos embriones confirmó el origen embrionario de estas células (datos no mostrados). Todos estos resultados sugerían fuertemente que la activación constitutiva de la vía de Notch promovía los primeros estadios de la diferenciación mieloide ejerciendo un bloqueo selectivo posterior sobre la diferenciación final a granulocitos, mientras que quedaría preservada la evolución a monocitos/macrófagos. Esta alteración era nuevamente, un efecto autónomo celular.

### **Notch, proliferación y apoptosis en la hematopoyesis embrionaria.**

Dependiendo del contexto biológico, la vía de Notch ha sido implicada en la regulación del ciclo celular, ya sea promoviendo la proliferación, por ejemplo en leucemias T (revisado en Grabher et al, 2006), o provocando una parada del ciclo celular, como en el borde de los compartimentos anterior y posterior del ala de *Drosophila* (Herranz et al, 2008). Tras la gastrulación, el embrión de ratón experimenta tasas vertiginosas de proliferación. Muy en particular, en el sistema hematopoyético los números celulares aumentan de forma logarítmica entre E10.5 y E14.5. Así, por ejemplo, a E11.5, hasta la mitad de los progenitores hematopoyéticos captan BrdU después de un pulso de 30 minutos (datos no mostrados).

Por todo ello, nos planteamos estudiar el posible efecto de la expresión constitutiva de N1ICD sobre la proliferación hematopoyética embrionaria. Como abordaje experimental utilizamos el colorante vital Hoescht 33342 (ver *Materiales y Métodos*), que nos permitía preservar las proteínas de membrana y la EGFP citoplasmática. Como control, utilizamos una muestra de timo adulto (Figura 22A), lo que nos permitió delimitar con nitidez las células que se encontraban quiescente o en fase G<sub>1</sub> (Figura 22A a) y las células en ciclo (fases G<sub>2</sub>-S-M, Figura 22A b).

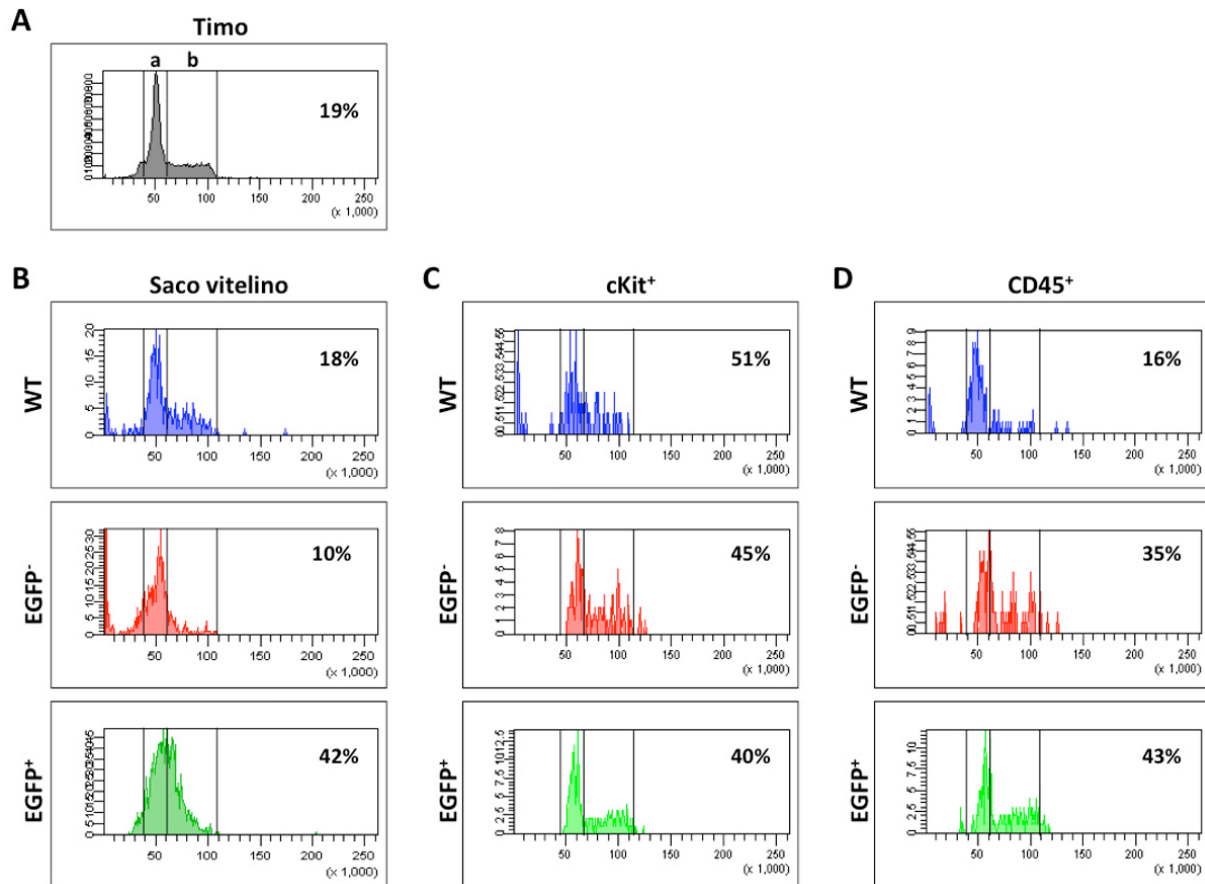
Como se observa en la Figura 22B, mientras un 20% de todas las células del saco vitelino de los embriones WT estaban en ciclo, este valor se incrementaba dramáticamente en las células EGFP<sup>+</sup> (el doble de células en ciclo). Las células EGFP<sup>-</sup> presentaron tasas levemente inferiores a las de los WT.

Al analizar la proliferación de los progenitores inmaduros cKit<sup>+</sup>, éstos contenían la mitad de sus células en G<sub>2</sub>-S-M en la población WT, no existiendo diferencias importantes con las células EGFP<sup>+</sup> y EGFP<sup>-</sup> (Figura 22C). Sin embargo, cuando comparamos el componente mieloide (CD45<sup>+</sup>), la situación cambiaba radicalmente de una población básicamente quiescente en las WT, a altas tasas de proliferación entre las células N1ICD<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> (Figura 22D). Igual que en otras de las alteraciones ya descritas, las células N1ICD<sup>-</sup>CD45<sup>+</sup> mostraron una tasa de proliferación intermedia, sugiriendo una influencia directa o indirecta de la activación constitutiva de Notch en las células presumiblemente adyacentes.

Sorprendentemente, la población CD45<sup>+</sup> constituía una fracción pequeña de todas las células del saco vitelino (entre el 3-4% en un embrión WT, Figura 16). Por esto, las diferencias observadas a en el saco vitelino total (Figura 22D) debían corresponder principalmente a los precursores y estadios intermedios de la línea eritroide.

Hallazgos similares fueron reproducidos con tinciones de yoduro de propidio sobre poblaciones EGFP<sup>+</sup> y EGFP<sup>-</sup> purificadas (datos no mostrados). Estos resultados nos permitieron concluir que la activación constitutiva de Notch en células hematopoyéticas embrionarias

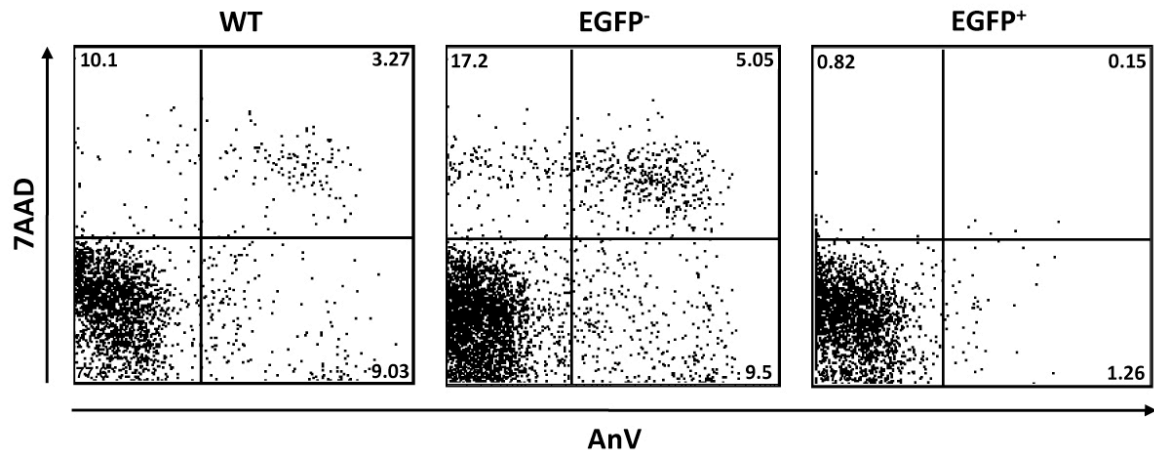
promovía la proliferación de estadios celulares intermedios y maduros que, en situación basal, entraban en quiescencia según avanzaban en la diferenciación.



**Figura 22.** La activación constitutiva de Notch conlleva un incremento en la tasa de proliferación celular. Estudio de la tasa de proliferación celular entre las poblaciones WT, EGFP<sup>-</sup> y EGFP<sup>+</sup> purificadas del saco vitelino mediante el colorante vital Hoescht 33342. **A.** Análisis del ciclo celular de una muestra de timo adulto, en la que se delimitan las células en G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> (a) y las células en ciclo (fases G<sub>2</sub>-S-M, b). **B.** Tasa de Proliferación de la suspensión celular WT, EGFP<sup>-</sup> y EGFP<sup>+</sup> procedente del saco vitelino completo que mostró un incremento de dos veces en el porcentaje de células en ciclo dentro del compartimento EGFP<sup>+</sup> respecto al WT. **C.** Estudio de la proliferación celular en el fracción cKit<sup>+</sup> del saco vitelino. que no experimentó cambios en las células transgénicas. **D.** Diferencias en el porcentaje de células en ciclo en la población de células CD45<sup>+</sup>. Este compartimento celular mostró un aumento en proliferación en células EGFP<sup>-</sup> y EGFP<sup>+</sup>.

Por otro lado, un cierto nivel de apoptosis se produce durante la diferenciación hematopoyética embrionaria (menor que la existente en la médula ósea adulta o en el timo), y nos planteamos investigar si podía ser parcialmente modulada por Notch. Para ello, realizamos un doble marcaje con Anexina V/7-ActinomicinaD (AnV/7AAD), que permiten distinguir las fases temprana y tardía de la apoptosis, así como la muerte celular por necrosis. Como se muestra en la Figura 23, las pequeñas frecuencias de células AnV<sup>+</sup>7AAD<sup>-</sup> (apoptosis inicial) y AnV<sup>+</sup>7AAD<sup>+</sup> (apoptosis avanzada) fueron sistemáticamente inferiores entre las células EGFP<sup>+</sup> que en las EGFP<sup>-</sup> y WT. Aunque los cambios celulares como consecuencia de la apoptosis eran menores en relación con los producidos por la proliferación celular, estos datos sugerían que la actividad de Notch inhibía parcialmente la apoptosis que tenía lugar en los progenitores hematopoyéticos de forma fisiológica.





**Figura 23.** Notch disminuye el porcentaje de células en apoptosis. Los marcajes con AnexinaV (Anv) y 7Actinomicina D (7AAD), permiten discriminar las células que se encuentran en las fases iniciales y tardías de la apoptosis, así como de las células que sufre necrosis. La activación de Notch (células EGFP<sup>+</sup>), conlleva una reducción en la tasa de muerte celular inicial (AnV<sup>+</sup>7AAD<sup>-</sup>) y tardía (AnV<sup>+</sup>7AAD<sup>+</sup>).

### Notch y la regulación de la hematopoyesis embrionaria.

A fin de intentar perfilar los fundamentos genéticos de los efectos observados bajo la activación constitutiva de la vía de Notch en precursores hematopoyéticos, decidimos seleccionar un amplio panel de factores de transcripción relevantes en la emergencia del sistema linfohematopoyético y el establecimiento de linajes celulares. Un abordaje intensivo a nivel genómico (en curso) puede revelar otras alteraciones y/o dianas no previstas *a priori*, pero, debido al número limitado de células disponible por embrión, optamos por una primera aproximación experimental por RT-PCR cuantitativa a tiempo real y semicuantitativa (ver *Materiales y Métodos*).

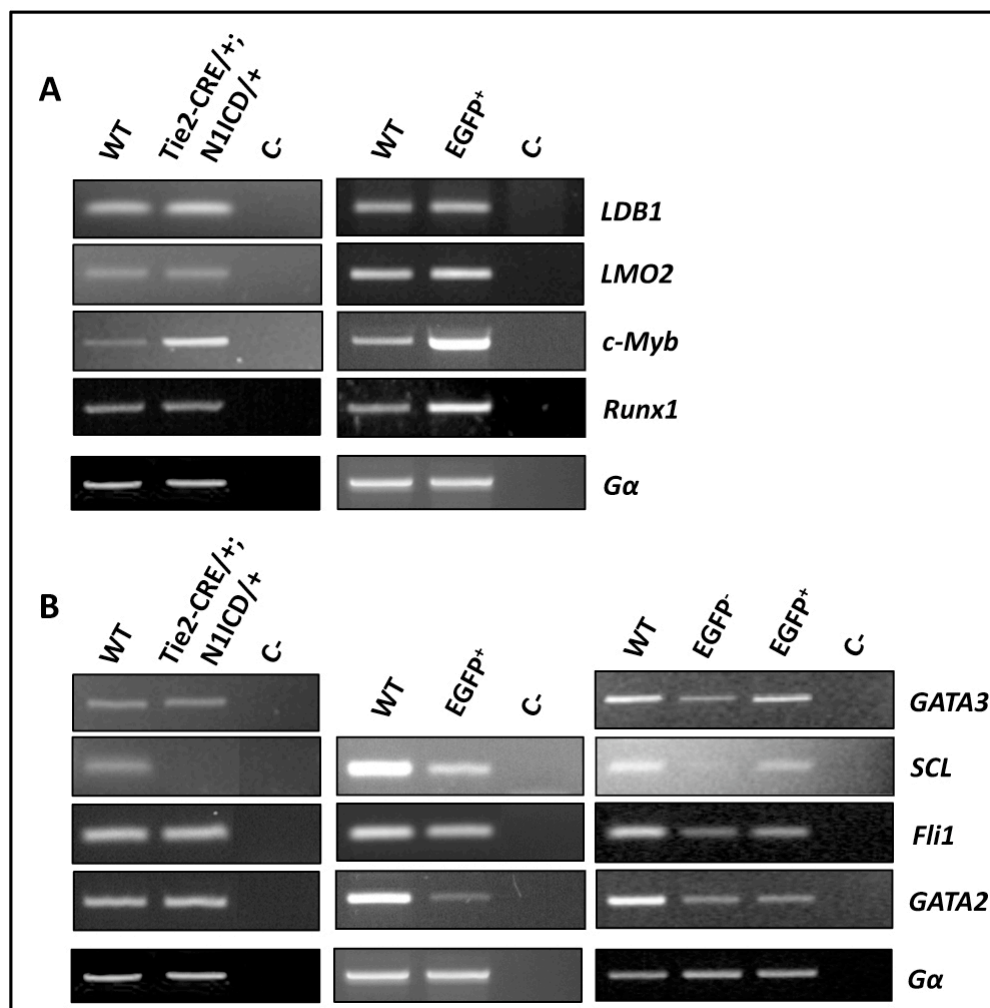
Por otra parte, realizamos muchos de estos análisis sobre poblaciones celulares purificadas lo que aumentaba la especificidad de los resultados así como los diferentes tipos celulares presentes en el sistema analizados. Priorizamos, por tanto, nuestro análisis sobre grupos de genes funcionalmente relacionados entre sí.

#### 1. La regulación genética en la emergencia de la hematopoyesis.

Estudios funcionales en ratón han demostrado el requerimiento de una serie de genes, que codifican en su mayor parte factores de transcripción, en el inicio de la hematopoyesis, el establecimiento de la onda definitiva y/o la especificación de sus diferentes linajes. En nuestros análisis genéticos, fijamos nuestra atención en la expresión de los más relevantes (Tabla 1): *SCL*, *Fli1*, *Ldb1*, *Lmo2*, *GATA2*, *GATA3* y *AML1/Runx1*. Como se muestra en la Figura 24, los niveles de *SCL* y *Fli1* fueron moderadamente reducidos en muestras de células EGFP<sup>+</sup> con respecto a las normales, mientras que las expresiones de *Ldb1* y *Lmo2* no variaron de forma significativa.

Por otro lado, la expresión de *GATA2* y *GATA3* ha sido relacionada con la hematopoyesis definitiva procedente de la P-Sp intraembrionaria. Mientras que este último gen no mostraba

cambios, la expresión relativa de *GATA2* estaba disminuida en todas las muestras de células *EGFP*<sup>+</sup> con respecto a las WT. Este hecho es particularmente inesperado pues diversos modelos experimentales han sostenido la inducción de *GATA2* en respuesta a la activación de Notch (de Pooter et al, 2006; Robert-Moreno et al, 2005). El mismo resultado obtuvimos cuando purificamos progenitores inmaduros multipotenciales

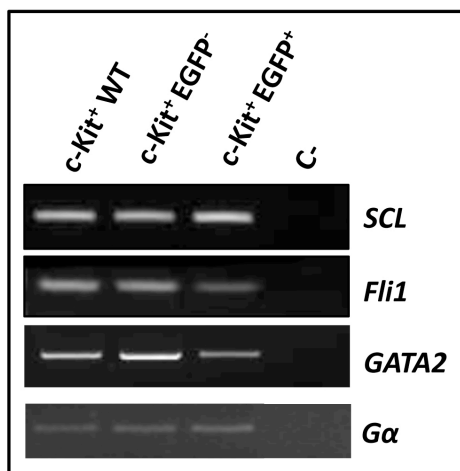


**Figura 24.** Análisis genético de la expresión de genes esenciales de la hematopoyesis embrionaria. Estudio por RT-PCR semicuantitativa de la expresión de genes esenciales para el desarrollo hematopoyético embrionario tanto en extractos totales del saco vitelino WT y Tie2-CRE/+;N1ICD/+ (paneles de la izquierda), como en las poblaciones WT, EGFP<sup>-</sup> y EGFP<sup>+</sup> purificadas (paneles centrales y de la derecha). **A.** Genes analizados en extractos totales de saco vitelino y fracciones WT y EGFP<sup>+</sup>. **B.** Genes analizados en extractos totales de saco vitelino y fracciones WT y EGFP<sup>+</sup>. Todas las muestras fueron igualadas con la expresión del gen de expresión ubicua *Gα*.

cKit<sup>+</sup>EGFP<sup>+</sup> y cKit<sup>+</sup>WT del saco vitelino y se repitieron los análisis cuantitativos con idéntica carga de cDNA por muestra (Figura 25). De esta manera, pudimos concluir que, en el contexto biológico analizado de los embriones Tie2-CRE/+;N1ICD/+, la activación constitutiva de Notch en progenitores hematopoyéticos multipotenciales se acompañaba de una menor expresión de *GATA2*. Considerando las influencias mutuas entre estos factores de transcripción y los cambios observados en *SCL* y *Fli1*, es posible que la expresión final de *GATA2* esté influenciada no sólo por Notch sino por otros mecanismos paralelos.

En cuanto a *AML1/Runx1*, investigaciones recientes en el pez cebra (Burns et al, 2005) y en el ratón (Nakagawa et al, 2006) sugieren la existencia del llamado *eje Notch-Runx* como una vía crucial para la generación de los progenitores hematopoyéticos definitivos, donde *AML1/Runx1* sería el mediador directo de la señalización de Notch. Sin embargo, cuando analizamos su nivel de expresión no apreciamos diferencias en los extractos totales de saco vitelino, aunque sí un ligero aumento en las células purificadas EGFP<sup>+</sup> respecto a las WT (Figura 24). Este resultado indicaba que, en el contexto experimental de la activación constitutiva de Notch, el postulado *eje Notch-Runx*, se veía moderadamente incrementado sólo en las células N1ICD<sup>+</sup> sugiriendo la existencia de un entramado genético complejo que regularía la transcripción de *AML1/Runx1* en los progenitores inmaduros además de Notch.

El único gen de este grupo que mostró un incremento importante y sistemático en todas las muestras analizadas, fue *c-Myb*. Está descrito en la literatura que su función no es esencial en el desarrollo hematopoyético temprano, pero su deficiencia es letal alrededor de E15.5-16 por anemia severa debida a la ausencia casi completa de eritropoyesis hepática (Tabla 1; Mucenski et al, 1991). A su vez, *c-Myb* está implicado en la proliferación de determinados linajes hematopoyéticos. El hecho de que la activación constitutiva de Notch resulte en un aumento de la transcripción de este gen no sólo en el saco vitelino total, sino en la población EGFP<sup>+</sup> de forma específica, sugiere fuertemente que Notch actuaría *upstream* de *c-Myb* regulándolo directa o indirectamente.



**Figura 25.** Expresión de *SCL*, *Fli1* y *GATA2* en los progenitores cKit<sup>+</sup>. Como se puede apreciar en la Figura, los progenitores inmaduros cKit<sup>+</sup> mostraron una expresión similar de *SCL* en las tres poblaciones purificadas, mientras que *Fli1* y *GATA2* se encuentran disminuidos en la población c-Kit<sup>+</sup>EGFP<sup>+</sup>.

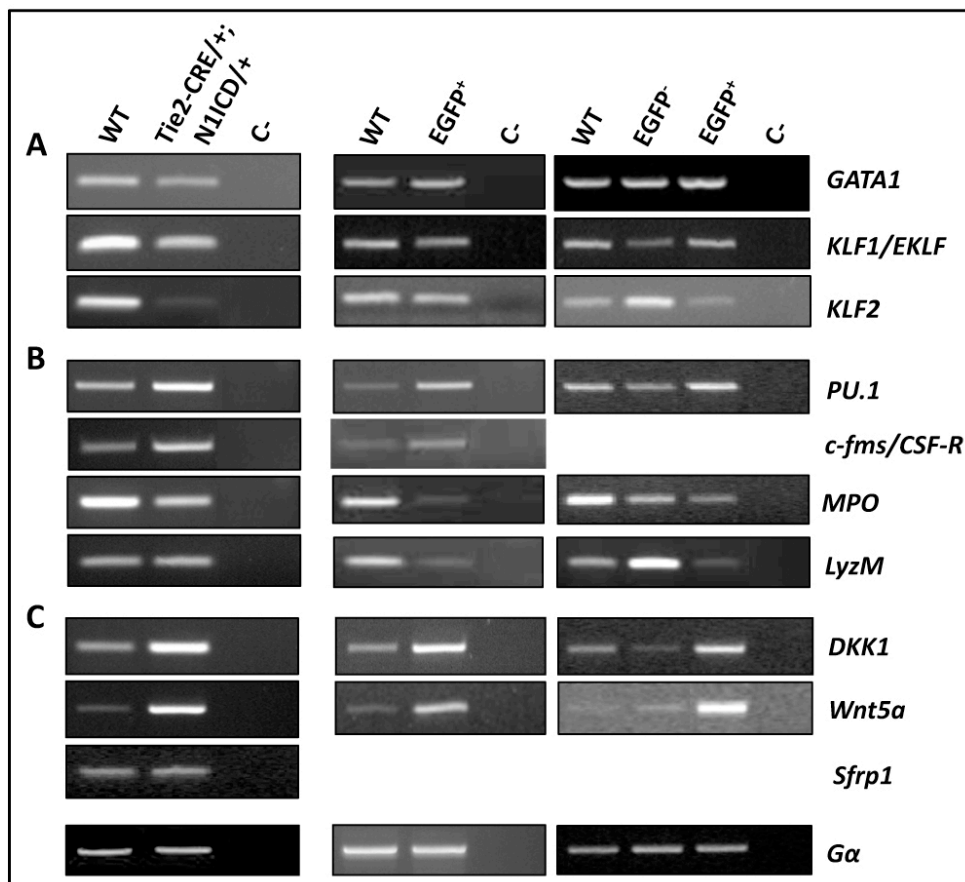
## 2. La regulación genética de la eritropoyesis y Notch.

Los embriones Tie2-CRE/+;N1ICD/+ presentan un bloqueo en la diferenciación eritroide en el estadio de formación de hemoglobina por parte de los precursores (Figura 19A y C). *GATA1* en cooperación con el llamado "*Friend of Gata1*" (*FOG1*), representa el gen clave para la especificación eritroide actuando en competición con *PU.1*. Tal y como se muestra en la Figura 26, su nivel de expresión no cambió de manera importante ni en los extractos totales de saco vitelino WT y transgénico, ni en las células hematopoyéticas purificadas WT EGFP<sup>-</sup> y EGFP<sup>+</sup>.

Aunque existen descripciones de regulación de *GATA1* en respuesta a señales de Notch1 (Ishiko et al, 2005; Lam et al, 2000) –aunque no a nivel transcripcional– esto no ocurría en el saco vitelino de los embriones Tie2-CRE/+;N1ICD/+. Sin embargo, la reducción observada de *GATA2* –que establece un balance de expresión y control de genes diana con *GATA1*– podría "equilibrar" las continuas señales provenientes del N1ICD. Por otro lado, la sobre-expresión de

*PU.1*, además de sus efectos sobre la mielopoyesis (ver apartado siguiente), podría contribuir al bloqueo eritroide, como ha sido descrito (revisado en Oikawa et al, 1999).

Al no observar cambios en la actividad transcripcional de *GATA1*, decidimos estudiar otros genes involucrados en el camino de especificación y maduración eritroide. Los factores de transcripción con dedos de Zn *Krüppel-like* controlan la expresión de múltiples genes de la diferenciación eritroide, por ejemplo, las globinas de la eritropoyesis primitiva y definitiva. Por ello, quisimos evaluar la expresión de los genes *EKLF/KLF1* y *KLF2*. En ambos casos, su expresión se vio notablemente disminuida tanto en el saco vitelino transgénico total, como en la población de células *EGFP<sup>+</sup>* respecto al WT (Figura 26A). Este resultado indicaba que los progenitores eritroides eran capaces de comenzar el camino de diferenciación con una expresión normal de *GATA1*, pero se verían incapaces de madurar hasta la producción de hemoglobina funcional por el bloqueo parcial de la transcripción de *EKLF/KLF1* y *KLF2*.



**Figura 26.** Estudio de la expresión génica de genes de linaje eritroide, mieloide y de la vía Wnt en los embriones transgénicos. **A.** Análisis por RT-PCR semicuantitativa de la expresión de genes esenciales para el desarrollo eritroide (*GATA1*, *KLF1* y *KLF2*), **B.** mieloide (*PU.1*, *c-fms*, *MPO* y *LyzM*) y **C.** de la vía no canónica de Wnt (*DKK1*, *Wnt5a* y *Sfrp1*), en extractos totales del saco vitelino WT y Tie2-CRE/+;N1ICD/+ (paneles de la izquierda), como en las poblaciones WT, EGFP<sup>+</sup> y EGFP<sup>-</sup> purificadas (paneles centrales y de la derecha). Todas las muestras fueron igualadas por RT-PCR a tiempo real para la expresión del gen ubicuo *Gα*.

### 3. La regulación genética de desarrollo mieloide y Notch.

Estudiamos la expresión transcripcional cuantitativa sobre suspensiones celulares del saco vitelino total de embriones WT y transgénicos, así como las poblaciones celulares purificadas

WT, EGFP<sup>+</sup> y EGFP<sup>-</sup>. Seleccionamos cuatro genes específicos de diferenciación mieloide: *PU.1*, *c-fms/CSF-R*, *mieloperoxidasa (MPO)* y *lisozima M (LyzM)*. PU.1 es un factor de transcripción determinante para la especificación/inicio de la diferenciación mieloide, y su expresión estaba aumentada en las células N1ICD<sup>+</sup>, así como la del gen que codifica para el receptor c-fms/CSF-R, que es una diana directa de PU.1 (Figura 26B). Por el contrario, la transcripción de los genes que codifican para enzimas de la maquinaria lítica de granulocitos maduros, MPO y LyzM, estaba muy reducida en el saco vitelino transgénico y en la población N1ICD<sup>+</sup> purificada respecto a WT. El hecho de encontrar la transcripción de los dos primeros genes incrementada y la de los dos últimos disminuida, correlacionaba con la promoción mieloide inicial y posterior bloqueo de la maduración descritos anteriormente (Figura 16 y 21).

#### 4. Las interacciones Notch-Wnt en hematopoyesis.

Un número limitado de vías de señalización subyacen de forma recurrente en el desarrollo y especificación de diferentes sistemas, órganos y linajes celulares, especialmente en el sistema hematopoyético, como por ejemplo: Wnt, BMP y Activina (Nostro et al, 2008); Hedgehog, EGF, ácido retinoico, Notch, etc. En la mayor parte de los casos, no actúan como módulos compartimentalizados sino que interactúan entre sí, lo que hace difícil su disección funcional aislada. En particular, se ha especulado sobre la colaboración Notch-Wnt en la biología de la autorrenovación (“*self-renewal*”) de células madre (Hayward et al, 2006; Hayward et al, 2005). Respecto a las HSC, la información es tan extensa como confusa (revisado en Duncan et al, 2005; Reya et al, 2003). Recientemente, ha sido descrito por el grupo de Gordon Keller un estudio bien controlado de generación de hematopoyesis a partir de células ES y no *in vivo*. En este trabajo, la activación de Notch a nivel de hemangioblastos Flk1<sup>+</sup> induce inhibidores secretados de la vía no canónica (beta-catenina independiente) de Wnt que suprimen función de la vía Wnt canónica (Cheng et al, 2008). Con ello, se estimula el desarrollo de la hematopoyesis, a expensas de otros destinos celulares, como, por ejemplo, la diferenciación cardíaca (Chen et al, 2008).

Para comprobar si un efecto similar ocurría en los embriones Tie2-CRE/+;N1ICD/+, analizamos la expresión diferencial de tres inhibidores de la vía no canónica de Wnt: *Wnt5a*, *DKK1* y *Sfrp1*. Como se muestra en la Figura 26C los dos primeros estaban muy incrementados en las células EGFP<sup>+</sup> purificadas, mientras que al tercero no mostraba diferencias apreciables (sólo realizado en extractos totales de saco vitelino). Estos resultados están en concordancia con los mencionados anteriormente para células ES, salvo que en dicho sistema, la hematopoyesis es promovida (Cheng et al, 2008) y en los embriones Tie2-CRE/+;N1ICD/+, está marcadamente inhibida.



# DISCUSIÓN





El trabajo experimental presentado en esta tesis doctoral se inició con la intención de estudiar el papel de Notch, una de las vías de señalización más importantes durante el desarrollo de múltiples tejidos, en la embriogénesis del sistema hematopoyético, el primero de ellos en ser funcional en el embrión.

### **La función de Notch es esencial para el desarrollo del sistema hematopoyético.**

Como hemos descrito en la introducción, la importancia esencial de la vía de señalización Notch en la hematopoyesis embrionaria y adulta queda demostrada por el hecho de que translocaciones y/o mutaciones que activan de forma constitutiva el receptor Notch1, son responsables aproximadamente del 50% de los casos de T-ALL (revisado en Grabher et al, 2006). La T-ALL es una alteración de los timocitos desarrollada principalmente en niños y adolescentes que puede afectar también al individuo adulto. Actualmente, cerca del 80% de los pacientes logran sobrevivir a esta forma severa de leucemia (revisado en Pui et al, 2004).

Trabajos basados principalmente en estudios de pérdida de función de la vía (Tabla 2) han ayudado a perfilar el papel de Notch durante el desarrollo hematopoyético. Sin embargo, encontramos escasos trabajos donde se aborde experimentalmente una aproximación de ganancia de función *in vivo*. A medida que avanzaba el trabajo presentado en esta tesis doctoral, fue publicado un estudio de sobre-expresión de N1ICD en los progenitores hematovasculares

Tie2<sup>+</sup> similar al nuestro, que describía el papel de Notch en varios tejidos durante la embriogénesis (Venkatesh et al, 2008).

Brevemente, los autores describen que la activación constitutiva de Notch en las células Tie2<sup>+</sup> conduce a una letalidad a E10.5 con alteraciones en el remodelado de vasculatura embrionaria y del saco vitelino, defectos cardíacos, de la musculatura lisa vascular y de la diferenciación hematopoyética (Venkatesh et al, 2008). En concreto, el fenotipo hematopoyético descrito se reduce a alteraciones en el desarrollo eritroide sin cambios en el linaje mieloide y en las poblaciones de progenitores inmaduros c-Kit<sup>+</sup>Flk1<sup>+</sup>. Además, por CFU-C, muestran una reducción de HSCs en el saco vitelino de los doble heterocigotos y por RT-PCR sugieren un aumento de marcadores tempranos de diferenciación (Flk1, c-Kit, SCL, Lmo2 y Runx1) y un descenso en la expresión de genes tardíos, como las globinas (Venkatesh et al, 2008).

Los resultados descritos en esta tesis muestran que la activación constitutiva de la vía de señalización Notch en los progenitores hematovasculares tempranos tiene un efecto letal a E10-10.5. Los rasgos fenotípicos más característicos de los embriones Tie2Cre/+;N1ICD/+ son: retraso del crecimiento; extrema palidez tanto del saco vitelino como de las grandes arterias intraembrionarias (Figura 9) y ausencia de *clusters* hematopoyéticos en el endotelio ventral de las mismas (Figura 13); un bloqueo parcial en la maduración eritroide en el saco vitelino (Figura 19) que es la causa del aspecto pálido de los embriones transgénicos (Figura 9), acompañada de una promoción de la diferenciación mieloide (Figura 16 y 21). Asimismo, existe un incremento de progenitores bipotenciales inmaduros (clásicamente, hemangioblastos o BL-CFCs) en el saco vitelino transgénico a E9.5 (Figura 17 y 18), así como de la proliferación en células CD45<sup>+</sup> (Figura 22). Estos precursores inmaduros están funcionalmente afectados manifestado en el gran descenso del número de colonias de todos los linajes hematopoyéticos generados *in vitro* en CFU-C (Figura 18).

Estos defectos sugieren un papel crucial de Notch durante el desarrollo del sistema hematopoyético, poniendo de relieve una función muy relevante en los estadios iniciales de la ontogénesis. Como ya hemos descrito en el apartado de *Resultados*, estas alteraciones hematopoyéticas unidas a los posibles defectos en la contractilidad y el volumen de eyección cardíacos (Figura 9D), resultan presumiblemente en defectos hemodinámicos letales entre E10-10.5.

### **La sobre-expresión de N1ICD en los progenitores Tie2<sup>+</sup> causa a una afectación severa de la hematopoyesis intraembrionaria.**

Los embriones Tie2-CRE/+;N1ICD/+ muestran una ausencia completa de hematopoyesis definitiva (Figura 14) acompañada de la presencia excepcional de *clusters* hematopoyéticos en el endotelio ventral de la arteria vitelina (Figura 13E-H). Por un lado, el hecho de no encontrar estos agregados adheridos a la pared ventral de la aorta dorsal ni en la arteria umbilical, sumado a que la arteria vitelina es la conexión directa entre el saco vitelino y el embrión, sugieren que existe una migración de células hematopoyéticas Runx1<sup>+</sup> (Figura 13G-H) desde este tejido hasta las grandes arterias intraembrionarias, quizá de camino al hígado fetal.

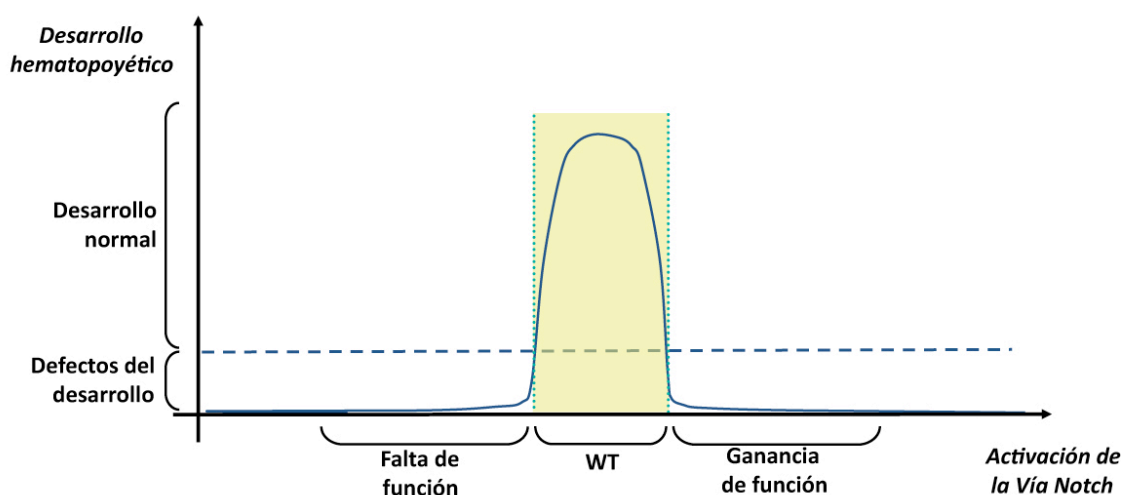
De acuerdo con estudios del grupo de S.I. Nishikawa (Shamockmalov et al 2007), existiría un flujo celular desde el saco vitelino a las arterias de la AGM, el hígado fetal y posteriormente, la médula ósea adulta. Como hemos descrito en la *Introducción*, aunque el trabajo es controvertido por el abordaje experimental utilizado, demuestra con claridad que al menos una población de las células presentes en los *clusters* hematopoyéticos de la aorta dorsal y en la médula ósea adulta,

proceden del saco vitelino extraembrionario. Nuestros resultados sugieren esta migración de progenitores hematopoyéticos desde el saco vitelino a los tejidos hematopoyéticos definitivos.

Con estos datos, ciertamente no podemos descartar que los *clusters* hematopoyéticos que observamos en la pared ventral de la arteria vitelina (Figura 13C-H) se hayan generado *in situ*. Sin embargo, del mismo modo deberían haberse formado también en la arteria umbilical, donde nunca los encontramos.

Estos hallazgos recientes nos hacen volver de nuevo a un paradigma clásico en el desarrollo hematopoyético: ¿Hay realmente un único sitio de origen de la hematopoyesis en el embrión o, por el contrario, es un evento redundante que tiene lugar en diferentes localizaciones embrionarias a lo largo del desarrollo? Aunque clásicamente se ha asumido que la hematopoyesis primitiva y definitiva son el resultado de dos programas genéticos bien diferenciados, y aún no completamente caracterizados, cada vez existen más evidencias de la interconexión de ambos, formando al fin un sistema funcional unitario con diferentes fases de desarrollo y maduración.

Por otro lado, resulta sorprendente que la sobre-activación de la vía Notch en los linajes hematovasculares a partir de E7.5, resulte en un fenotipo similar al observado en los modelos de falta de función de la vía (Tabla 3) en cuanto a lo que se refiere a la hematopoyesis intraembrionaria. Como hemos detallado en la introducción, varios trabajos describieron el papel esencial de Notch1 para el comienzo normal de la hematopoyesis definitiva, mientras que permanecía dispensable para aquella generada en el saco vitelino temprano (Hadland et al, 2004; Kumano et al, 2003).



**Figura 27.** Modelo de activación de Notch en el desarrollo hematopoyético. La señalización por Notch en los progenitores hematopoyéticos requiere un rango estrecho de activación (en amarillo) para llevar a cabo su función correctamente –como en una situación WT– resultando en un desarrollo hematopoyético normal. De esta manera, tanto la falta como la ganancia de función fuera de esa franja conllevan un fallo en la comunicación intercelular y una alteración del sistema en desarrollo.

La ausencia total de células CD45<sup>+</sup> en la porción caudal de los embriones Tie2-CRE/+;N1ICD/+ a E9.5 (Figura 14) sugieren que existe un efecto dosis dependiente a la activación de Notch durante el desarrollo hematopoyético. De esta manera, sería necesario un equilibrio muy preciso de dicha activación para llevar a cabo la función de forma correcta (Figura 27). Así, tanto la falta como la ganancia de función por encima o por debajo de ese fino umbral, conlleva un fallo intrínseco en el sistema de señalización que resultaría en un bloqueo del desarrollo

hematopoyético. En la literatura encontramos un efecto similar descrito para la pérdida y la ganancia de función de Notch1 en cuanto a su papel en la vasculogénesis y el remodelado vascular del embrión (Limbourg et al, 2005; Venkatesh et al, 2008).

### **La sobreactivación de Notch en progenitores hematovasculares tempranos mantiene en el tiempo la población de hemangioblastos embrionarios.**

Los datos expuestos en la Figura 17, ponen de manifiesto que, como consecuencia de la activación constitutiva de Notch en los progenitores hematovasculares tempranos Tie2<sup>+</sup>, se expande en el tiempo la población de hemangioblastos/BL-CFCs embrionarios. Estas células bipotenciales que desde principios del siglo pasado han sido postuladas como precursoras directas de endotelio y sangre en el saco vitelino (His, 1900; Sabin, 1917; Murray, 1932) y debieran haber desaparecido a E7.5-8, en los embriones Tie2-CRE/+;N1ICD/+, se mantienen hasta E9.5-10. El aumento de progenitores inmaduros cKit<sup>+</sup>, cKit<sup>+</sup>Tie2<sup>+</sup>, cKit<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup> y cKit<sup>+</sup>Kdr<sup>+</sup> (Figura 17) unido a la formación de colonias con ambos componentes, hematopoyético y vascular (Figura 18 C-F), suponen evidencias claras de la persistencia de esta población de células bipotenciales (Huber et al, 2004) en el tiempo. Es la primera vez que se describe un fenotipo similar. Además, como la recombinación sólo ocurre en las células Tie2<sup>+</sup> donde la actividad de la recombinasa CRE ha sido eficiente (Figura 15), este resultado indica que al menos una parte de los hemangioblastos/BL-CFCs embrionarios, si no todos, deben pasar por un estadio Tie2<sup>+</sup> –para quedar bajo la influencia de la actividad constitutiva de N1ICD–.

Por otro lado, que los precursores hematopoyéticos tempranos se mantengan en el tiempo podría deberse a la acción de Notch en la regulación de la tasa de proliferación. De esta manera, podrían mantenerse los hemangioblastos/BL-CFCs con la maquinaria celular no preparada para emprender el camino de la maduración hacia estadios hematopoyéticos más diferenciados. Sin embargo, el aumento de proliferación que observamos en el saco vitelino de los embriones Tie2-CRE/+;N1ICD/+ (Figura 22B) es debido a las células hematopoyéticas ya comprometidas EGFP<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> (Figura 22B), entre otras, y no a los progenitores inmaduros EGFP<sup>+</sup>cKit<sup>+</sup> (Figura 22C).

Otra posibilidad podría ser que no se tratara realmente de una pequeña población de hemangioblastos tempranos que debían haber desaparecido a E7.5-8. Podría tratarse simplemente de un linaje de progenitores hematopoyéticos o vasculares inmaduros pero ya comprometidos, en los cuales Notch mantendría el “recuerdo” de esa bipotencialidad. De esta manera, en los ensayos de CFU-C serían capaces de generar todavía colonias hematopoyéticas y células que conservarían el fenotipo endotelial incluso en un contexto no óptimo para ello.

Recientemente, se han publicado varios trabajos en los que se muestran que *in vitro* las BL-CFCs antes de generar los progenitores hematopoyéticos deben pasar por un estadio endotelial que es transitorio (Chen et al, 2009; Eilken et al, 2009; Lancrin et al, 2009). Estos resultados corroboran la íntima relación que existe entre ambos linajes durante su desarrollo temprano en el embrión. Sin embargo, qué papel desempeña Notch en estos primeros estadios de la ontogénesis hematopoyética para prolongar en el tiempo la población de progenitores bipotenciales cuando es sobre-activado constitutivamente, son preguntas abiertas que supondrán, sin duda, temas importantes de investigación.

De hecho, los resultados presentados en esta tesis doctoral sugieren que Notch actuaría muy temprano, en los estadios más iniciales de la hematopoyesis posiblemente a través de la regulación del ciclo celular y de algunos de los factores de transcripción cruciales en este proceso, como *Fli1* y *Gata2* (Hart et al, 2000; Spyropoulos et al, 2000; Tsai et al, 1994) que se encuentran

disminuidos no sólo en los extractos de saco vitelino total y en las poblaciones purificadas (Figura 24), sino también en los progenitores inmaduros cKit<sup>+</sup> (Figura 26).

### **Activación constitutiva de Notch: promoción inicial y bloqueo posterior de la maduración eritroide y mieloide.**

Una alteración sorprendente de los embriones transgénicos es la promoción incrementada de los progenitores multipotenciales a entrar en la vía de maduración eritroide y mieloide que existe inicialmente, seguida del repentino bloqueo e incapacidad de progresar hasta la formación de células efectoras maduras. Un efecto parecido ya ha sido descrito en la literatura en otros contextos celulares: la señalización Notch potencia la granulopoyesis de la línea de mieloblastos 32D (Tan-Pertel et al, 2000) y sería necesaria, además, para la diferenciación de células dendríticas y macrófagos (Cheng et al, 2003), aunque inhibiría la maduración terminal de estos linajes.

#### Notch y la maduración eritroide.

Los marcajes en células WT, EGFP<sup>-</sup> y EGFP<sup>+</sup> de CD71 y Ter119 (Figura 19A) muestran que en la población EGFP<sup>+</sup> de los embriones Tie2-CRE/+;N1ICD/+ existe una clara disminución de células eritroides más diferenciadas CD71<sup>+</sup>Ter119<sup>+</sup>. Sin embargo, el grueso celular se concentra en el estadio intermedio de maduración CD71<sup>+</sup>Ter119<sup>-</sup>, indicando que la activación constitutiva de Notch dirige a los progenitores eritroides hacia la maduración, pero una vez activado el programa de diferenciación quedan bloqueados. De esta manera, los eritroblastos EGFP<sup>+</sup> nunca alcanzan el estadio final, no llegan a sintetizar hemoglobina, produciendo así, el aspecto pálido del saco vitelino, del embrión (Figura 9) y de los *pellets* procedentes de suspensiones celulares de estos tejidos (Figura 19B).

El hecho de encontrar una actividad transcripcional normal de *GATA1*, pero disminuida de *KLF1/EKLF* y *KLF2* en el saco vitelino transgénico y concretamente en la población EGFP<sup>+</sup> (Figura 26), constituyen el correlato genético del fenotipo descrito en el párrafo anterior. Sin embargo, con nuestros datos no podemos diferenciar si el fenotipo que observamos es consecuencia de la actividad de Notch sobre *KLF1/EKLF* y *KLF2*, o bien es el bloqueo en la maduración eritroide inducida por Notch, el que produce la disminución de expresión en estos genes. ).

Como hemos comentado brevemente en el apartado de *Resultados*, un estudio reciente demuestra que la activación de Notch dirige las HSCs hacia la diferenciación y maduración a megacariocitos (Mercher et al, 2008). El postulado sobre la existencia de un progenitor común para eritrocitos y megacariocitos ha sido un tema aceptado por la comunidad científica. Sin embargo, qué función concreta realiza Notch en la divergencia de ambos linajes siguen siendo preguntas abiertas. Nuestros resultados indican que la activación de la vía mantiene/favorece moderadamente el linaje megacariocítico a expensas del bloqueo parcial del eritroide.

#### Notch y la diferenciación mieloide.

La literatura acerca del papel de Notch en la mielopoyesis embrionaria es controvertido. Algunos trabajos han descrito un papel inhibitorio de Notch de la diferenciación mieloide en células 32D (Bigas et al, 1998; Kumano et al, 2001; Milner et al, 1996), pero también hay evidencias de que la activación constitutiva de Notch en esta línea celular promueve una mielopoyesis acelerada (Schroeder & Just, 2000; Tan-Pertel et al, 2000). Estos resultados aparentemente contradictorios pueden reflejar simplemente las diferencias entre las poblaciones de células 32D utilizadas en cada estudio (Migliaccio et al, 1989). Sin embargo, recientemente se

ha descrito que en progenitores primarios purificados del hígado fetal y derivados de células ES, Notch inhibe el destino mieloide a través de la activación de GATA2 (de Pooter et al, 2006).

Nuestros resultados muestran que *in vivo*, como consecuencia de la sobre-activación de Notch en las células hematovasculares Tie2<sup>+</sup>, en el saco vitelino transgénico existe, por un lado una promoción mieloide inicial acelerada seguida de un posterior bloqueo en la maduración de esas células ya comprometidas en la población EGFP<sup>+</sup> (disminución de porcentaje de células c-Kit<sup>+</sup> CD45<sup>+</sup>; Figura 16). De acuerdo con este resultado, la expresión en el saco vitelino transgénico y en la población EGFP<sup>+</sup> de *PU.1*, —que dirige los progenitores hemapoyéticos hacia linaje mieloide— y uno de sus genes diana, *c-fms/CSF-R*, está aumentada. Sin embargo, la expresión de *MPO* y *LyzM* —expresada por células mieloides maduras— está sistemáticamente disminuida (Figura 26). Este resultado sugiere que las células son capaces de comenzar el camino de diferenciación mieloide, expresar los primeros marcadores propios de este linaje pero quedan bloqueadas en un estadio intermedio de la maduración.

Todos los datos presentados en esta tesis y los ya publicados en la literatura, aparentemente contradictorios unos con otros, indican que la función de Notch en la mielopoyesis embrionaria podría ser temporal y/o dependiente del contexto. Es decir, en función del ambiente y el estadio de desarrollo en que se encuentren los progenitores hematopoyéticos embrionarios, son capaces de responder de manera diferencial a la señalización por Notch. Consideramos que los datos más concluyentes son aquellos en los que las células son extraídas directamente de su nicho biológico *in vivo* o los que intentan reproducir con la mayor fidelidad posible el contexto celular embrionario. Por eso, los resultados presentados en esta tesis (Figura 16 y 21) junto con los de grupo de J.C. Zúñiga-Plücker (de Pooter et al, 2006), indican claramente que Notch promueve inicialmente la diferenciación de los progenitores al destino mieloide pero, por mecanismos que quedan por estudiar, inhibe su maduración final.

En su conjunto, estos resultados sugieren que Notch en el proceso de mielopoyesis es requerido en una ventana temporal muy precisa, de manera que, en condiciones normales (embrión WT), se activaría para inducir en los progenitores el destino mieloide y posteriormente, se apagaría para que la célula continuase el proceso normal de maduración. En los embriones Tie2-CRE/+;N11CD/+, la activación constitutiva de Notch promueve este destino de forma acelerada a nivel de los precursores mieloides y, al no verse inhibida su función, impediría que las células ya comprometidas progresasen en su maduración manteniéndolas en un continuo estado proliferativo. De hecho, como ya hemos descrito el aumento en la proliferación que existe en el saco vitelino de los embriones transgénicos es debido a las células EGFP<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> (Figura 22), que a E9.5 está compuesta en su mayor parte por células hematopoyéticas de linaje mieloide.

### **La sobre-activación de la vía Notch conduce a un incremento en la tasa de proliferación y una disminución de la apoptosis.**

Como hemos mostrado en la Figura 22, en el saco vitelino total de los embriones Tie2-CRE/+;N11CD/+ existe un aumento importante en el porcentaje de células que están en ciclo. Cuando lo analizamos en detalle, vemos que este aumento reside en las células EGFP<sup>+</sup> y concretamente, en las células CD45<sup>+</sup> ya comprometidas en la diferenciación y maduración hematopoyética, y no en los progenitores inmaduros cKit<sup>+</sup>.

Un dato curioso y sorprendente es el resultado aparentemente paradójico que muestra un aumento sustancial de los progenitores hematopoyéticos inmaduros cKit<sup>+</sup> dentro de la población EGFP<sup>+</sup> (Figura 16 y 17), sin que exista un incremento proporcional de la proliferación en este compartimento celular (Figura 22, paneles centrales) ¿Cómo expandir una población celular

sin aumentar su proliferación? Una posibilidad es que el efecto de Notch sobre el ciclo celular sea temporal y diferencial en cada linaje, de manera que la máxima tasa de proliferación en los progenitores hematopoyéticos inmaduros cKit<sup>+</sup> podría ser anterior al estadio que hemos analizado. Así, observamos una tasa de proliferación normal en las células cKit<sup>+</sup> a E9.5, junto con una población expandida como resultado del aumento de dicha tasa en estadios anteriores.

Sin embargo, como hemos apuntado en el apartado de *Resultados*, aunque la tasa de proliferación en células CD45<sup>+</sup> es muy alta (Figura 22, paneles de la derecha), esta población representa entre el 3-4% del total de células del saco vitelino en embriones WT (Figura 16). Por tanto, no serían las responsables completamente del aumento global en la tasa de proliferación que observamos en este tejido transgénico (Figura 22, paneles de la izquierda). Este resultado sugiere sin duda que existen otras poblaciones con una proliferación incrementada, presumiblemente progenitores y estadios intermedios de la línea eritroide.

En cuanto a la tasa de muerte celular, la población EGFP<sup>+</sup> de los embriones transgénicos muestra una disminución de la apoptosis (Figura 23). Este resultado está en aparente contradicción con un trabajo reciente que muestra que en los embriones deficientes del gen *RBPJk* poseen una acumulación de células eritroides en el saco vitelino debido a una disminución de la apoptosis (Robert-Moreno et al, 2007). Aunque los resultados de este estudio no son totalmente claros, esta controversia pone de manifiesto otro ejemplo en el que Notch precisaría un rango de activación muy estrecho para poder realizar su función correctamente. De esta manera, tanto la pérdida como la ganancia de función de la vía resultarían en un fenotipo similar. Estudios posteriores serán necesarios para perfilar con detalle la función de la vía Notch en la regulación de la apoptosis en el saco vitelino.

### **Los embriones Tie2-CRE/+;N1ICD/+ presentan una alteración selectiva de la expresión de factores de transcripción claves durante la hematopoyesis embrionaria.**

En las últimas décadas, se han descrito un numeroso grupo de factores de transcripción esenciales en las primeras etapas de la definición de los progenitores hematopoyéticos a partir de los hemangioblastos en el saco vitelino. De hecho, la literatura se habla acerca del *núcleo genético regulador* de la hematopoyesis embrionaria. Experimentos funcionales han demostrado el requerimiento de una serie de genes, que codifican en su mayor parte factores de transcripción, en el inicio de la hematopoyesis, el establecimiento de la onda definitiva y/o en la especificación de sus diferentes linajes. Siguiendo las ideas de E.H. Davidson –en el modelo del erizo de mar– los grupos de B. Gottgens, R. Patient y L. Zon entre otros, intentan describir ese núcleo genético fundamental de componentes indispensables que, por medio de interacciones mutuas, procesos de retroalimentación positiva y funcionamiento en complejos multiproteicos, hace posible el establecimiento de la hematopoyesis embrionaria.

En el análisis genético presentado en las Figuras 24-26, quisimos evaluar la posible modulación por Notch de los factores de transcripción más importantes desde las primeras etapas del desarrollo hematopoyético. Genes como *SCL*, *LMO2*, *LDB1*, *GATA2* y *Fli1*, han sido implicados de forma crucial en estos estadios tempranos de desarrollo. Recientemente se ha demostrado que *Fli1* actuaría por encima de los anteriores regulando algunos de ellos.

Como se muestra en la Figura 24, aunque *LMO2* y *LDB1* no experimentaban cambios sustanciales, *GATA2*, *Fli1* y más moderadamente *SCL*, estaban sistemáticamente disminuidos en todas las muestras de saco vitelino transgénico total y en las células EGFP<sup>+</sup>. Cuando examinamos la expresión de estos tres últimos en los precursores inmaduros cKit<sup>+</sup> en las poblaciones WT, EGFP<sup>-</sup> y EGFP<sup>+</sup> purificadas, obtuvimos resultados similares, sugiriendo que la acción de Notch

sobre *GATA2*, *SCL* y *Fli1*, ocurría ya en estadios muy tempranos de desarrollo hematopoyético. De hecho los defectos en los progenitores multipotenciales N1CD<sup>+</sup> (Figura 18), podrían deberse en gran parte a la represión transcripcional que sufren estos tres genes. Este resultado pone de manifiesto dos puntos clave: (1) Notch actuaría muy temprano –E7.0-7.5– *upstream* de todos ellos, modulando su expresión, quizá a nivel de los hemangioblastos/BL-CFCs bipotenciales; y (2) estos progenitores hematopoyéticos multipotenciales tempranos deben expresar en algún momento de su ontogenia el gen *Tie2*, para poder recibir la influencia de la sobre-activación de Notch. La relación epistática de Notch y los genes del núcleo genético regulador de la hematopoyesis embrionaria, constituirán temas de investigaciones posteriores.

Finalmente, las interacciones de Notch con otras vías de señalización durante el desarrollo de múltiples tejidos ha sido tema de estudio durante los últimos años. Como hemos dicho anteriormente, recientemente se han descrito interacciones Notch-Wnt en la generación de progenitores hematopoyéticos *in vitro* a partir de células ES (Cheng et al, 2008). Que la activación constitutiva de Notch resulte en una expresión incrementada de *DKK1* y *Wnt5a* –inhibidores de la vía no canónica de Wnt– de una manera autónoma celular (Figura 26), muestran una comunicación real de estas dos vías quizá modulando los primeros estadios del desarrollo hematopoyético. Estudios posteriores serán necesario para perfilar en detalle esta intercomunicación de Notch y Wnt, así como con otras vías de señalización (Nostro et al, 2008).

## Reflexiones finales.

A la luz de nuestros resultados, cabe plantearse una pregunta fundamental: ¿Qué es lo que está ocurriendo en los embriones donde hemos sobre-activado Notch de forma constitutiva en los progenitores hematovasculares Tie2<sup>+</sup> para que resulte un efecto letal embrionario? El trabajo de esta tesis muestra que Notch1 es crucial en la definición de los primeros progenitores hematopoyéticos regulando potencialmente la función de genes esenciales en las fases tempranas del desarrollo, como son *Fli1* y *GATA2* (Hart et al, 2000; Spyropoulos et al, 2000; Tsai et al, 1994). De esta manera, la sobre-activación constitutiva de Notch en las células hematopoyéticas más inmaduras va produciendo en ellas un “agotamiento celular” por el que son funcionalmente incapacitadas para madurar hasta los estadios finales de la diferenciación.

Sin embargo, ¿por qué, entonces, no encontramos un bloqueo total de la diferenciación eritroide y mieloide? Sin duda, existe un grupo de células que consiguen escapar a la acción de Notch y son seguramente aquellas que provienen bien de progenitores hematovasculares Tie2<sup>-</sup>, o bien de los Tie2<sup>+</sup> donde la recombinasa CRE no ha activado el transgén (Figura 15).

En los embriones Tie2-CRE/+;NICD/+ va más allá de lo que está descrito en los modelos de falta de función de Notch publicados en la literatura (Tabla 2). La activación constitutiva de Notch en los progenitores hematovasculares Tie2<sup>+</sup>, nos ha mostrado resultados hasta ahora no descritos. En primer lugar, la falta de función de Notch no parece afectar funcionalmente las células Tie2<sup>+</sup>, que aparecen en estadios tempranos de desarrollo en los tejidos extraembrionarios (Dumont et al, 1992; Kisanuki et al, 2001), puesto que el fenotipo de los modelos de falta de función de Notch, la hematopoyesis del saco vitelina aparece preservada.

Sin embargo, la sobre-activación de la vía en estos progenitores, tiene efectos tan severos que son letales para el embrión. Este hecho es muy presumiblemente el resultado de la activación constitutiva de Notch en los progenitores inmaduros Tie2<sup>+</sup>. De esta manera, nuestro modelo de ganancia de función pone en relieve funciones de Notch en las fases más tempranas de la ontogenia hematopoyética del saco vitelino, que quedan velada en los modelos de falta de función.



# CONCLUSIONES



## Conclusiones:

1. La sobre-activación de la vía Notch en los linajes vascular y hematopoyético a partir de E7.5 causa un efecto letal embrionario presumiblemente debido a defectos hematovasculares que alteran la hemodinámica impidiendo un correcto aporte de oxígeno y nutrientes a todas las células del organismo, siendo letal entre E10-10.5.
2. La expresión constitutiva de N1ICD promueve la sobreactivación de la vía en los linajes hematopoyéticos y sus derivados, e induce señales intercelulares que activan la vía Notch endógena del resto de células (EGFP-) hematopoyéticas.
3. La ganancia de función de Notch en las células Tie2<sup>+</sup> expande y/o mantiene en el saco vitelino el número de progenitores más inmaduros.
4. La expresión constitutiva de N1ICD desde estadios tempranos desarrollo hematopoyético aumenta la población intermedia de progenitores multipotenciales, posiblemente relacionadas con la *transit-amplifying cell population*.
5. La acción incrementada de Notch en células hematopoyéticas embrionarias promueve la proliferación de estadios celulares intermedios y maduros que, en situación basal, entran en quiescencia según avanzan en la diferenciación.
6. La activación constitutiva de Notch actuaría sobre la diferenciación eritroide inhibiéndola parcialmente, mientras que no influiría o incluso favorecería el desarrollo de megacariocitos.
7. La activación constitutiva de Notch promueve los primeros estadios de la diferenciación mieloide ejerciendo un bloqueo selectivo posterior sobre la diferenciación final a granulocitos, mientras que la evolución a monocitos/macrófagos queda preservada.



# BIBLIOGRAFÍA



- Amsen D, Antov A, Jankovic D, Sher A, Radtke F, Souabni A, Busslinger M, McCright B, Gridley T, Flavell RA (2007) Direct regulation of Gata3 expression determines the T helper differentiation potential of Notch. *Immunity* **27**(1): 89-99
- Asari S, Sakamoto A, Okada S, Ohkubo Y, Arima M, Hatano M, Kuroda Y, Tokuhisa T (2005) Abnormal erythroid differentiation in neonatal bcl-6-deficient mice. *Exp Hematol* **33**(1): 26-34
- Balisky BI. Embryonic adaptations and the development of mammals. En: An Introduction to embryology. 5th Edition. *CBS Collage Publishing*. Capítulo 11: 323.
- Basu P, Morris PE, Haar JL, Wani MA, Lingrel JB, Gaensler KM, Lloyd JA (2005) KLF2 is essential for primitive erythropoiesis and regulates the human and murine embryonic beta-like globin genes in vivo. *Blood* **106**(7): 2566-2571
- Bertrand JY, Giroux S, Golub R, Klaine M, Jalil A, Boucontet L, Godin I, Cumano A (2005a) Characterization of purified intraembryonic hematopoietic stem cells as a tool to define their site of origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(1): 134-139
- Bertrand JY, Jalil A, Klaine M, Jung S, Cumano A, Godin I (2005b) Three pathways to mature macrophages in the early mouse yolk sac. *Blood* **106**(9): 3004-3011
- Bettenhausen B, Hrabe de Angelis M, Simon D, Guenet JL, Gossler A (1995) Transient and restricted expression during mouse embryogenesis of Dll1, a murine gene closely related to Drosophila Delta. *Development* **121**(8): 2407-2418
- Bigas A, Martin DI, Milner LA (1998) Notch1 and Notch2 inhibit myeloid differentiation in response to different cytokines. *Mol Cell Biol* **18**(4): 2324-2333
- Blank V, Kourilsky P, Israel A (1992) NF-kappa B and related proteins: Rel/dorsal homologies meet ankyrin-like repeats. *Trends Biochem Sci* **17**(4): 135-140
- Blaumueller CM, Qi H, Zagouras P, Artavanis-Tsakonas S (1997) Intracellular cleavage of Notch leads to a heterodimeric receptor on the plasma membrane. *Cell* **90**(2): 281-291
- Bolos V, Grego-Bessa J, de la Pompa JL (2007) Notch signaling in development and cancer. *Endocr Rev* **28**(3): 339-363
- Bruckner K, Perez L, Clausen H, Cohen S (2000) Glycosyltransferase activity of Fringe modulates Notch-Delta interactions. *Nature* **406**(6794): 411-415
- Burns CE, Traver D, Mayhall E, Shepard JL, Zon LI (2005) Hematopoietic stem cell fate is established by the Notch-Runx pathway. *Genes Dev* **19**(19): 2331-2342
- Chen MJ, Yokomizo T, Zeigler BM, Dzierzak E, Speck NA (2009) Runx1 is required for the endothelial to haematopoietic cell transition but not thereafter. *Nature* **457**(7231): 887-891
- Chen VC, Stull R, Joo D, Cheng X, Keller G (2008) Notch signaling respecifies the hemangioblast to a cardiac fate. *Nat Biotechnol* **26**(10): 1169-1178
- Cheng P, Nefedova Y, Miele L, Osborne BA, Gabrilovich D (2003) Notch signaling is necessary but not sufficient for differentiation of dendritic cells. *Blood* **102**(12): 3980-3988
- Cheng X, Huber TL, Chen VC, Gadue P, Keller GM (2008) Numb mediates the interaction between Wnt and Notch to modulate primitive erythropoietic specification from the hemangioblast. *Development* **135**(20): 3447-3458
- Choi K, Kennedy M, Kazarov A, Papadimitriou JC, Keller G (1998) A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development* **125**(4): 725-732
- Conlon RA, Reaume AG, Rossant J (1995) Notch1 is required for the coordinate segmentation of somites. *Development* **121**(5): 1533-1545
- Cumano A, Dieterlen-Lievre F, Godin I (1996) Lymphoid potential, probed before circulation in mouse, is restricted to caudal intraembryonic splanchnopleura. *Cell* **86**(6): 907-916

- de la Pompa JL, Wakeham A, Correia KM, Samper E, Brown S, Aguilera RJ, Nakano T, Honjo T, Mak TW, Rossant J, Conlon RA (1997) Conservation of the Notch signalling pathway in mammalian neurogenesis. *Development* **124**(6): 1139-1148
- de Pooter RF, Schmitt TM, de la Pompa JL, Fujiwara Y, Orkin SH, Zuniga-Pflucker JC (2006) Notch signaling requires GATA-2 to inhibit myelopoiesis from embryonic stem cells and primary hemopoietic progenitors. *J Immunol* **176**(9): 5267-5275
- Deblandre GA, Lai EC, Kintner C (2001) Xenopus neuralized is a ubiquitin ligase that interacts with XDelta1 and regulates Notch signaling. *Dev Cell* **1**(6): 795-806
- Del Amo FF, Smith DE, Swiatek PJ, Gendron-Maguire M, Greenspan RJ, McMahon AP, Gridley T (1992) Expression pattern of Motch, a mouse homolog of Drosophila Notch, suggests an important role in early postimplantation mouse development. *Development* **115**(3): 737-744
- Del Monte G, Grego-Bessa J, Gonzalez-Rajal A, Bolos V, De La Pompa JL (2007) Monitoring Notch1 activity in development: Evidence for a feedback regulatory loop. *Dev Dyn* **236**(9): 2594-2614
- Delassus S, Cumano A (1996) Circulation of hematopoietic progenitors in the mouse embryo. *Immunity* **4**(1): 97-106
- Dieterlen-Lievre F (1975) On the origin of haemopoietic stem cells in the avian embryo: an experimental approach. *J Embryol Exp Morphol* **33**(3): 607-619
- Dieterlen-Lievre F, Martin C (1981) Diffuse intraembryonic hemopoiesis in normal and chimeric avian development. *Dev Biol* **88**(1): 180-191
- Dumont DJ, Gradwohl G, Fong GH, Puri MC, Gertsenstein M, Auerbach A, Breitman ML (1994) Dominant-negative and targeted null mutations in the endothelial receptor tyrosine kinase, tek, reveal a critical role in vasculogenesis of the embryo. *Genes Dev* **8**(16): 1897-1909
- Dumont DJ, Yamaguchi TP, Conlon RA, Rossant J, Breitman ML (1992) tek, a novel tyrosine kinase gene located on mouse chromosome 4, is expressed in endothelial cells and their presumptive precursors. *Oncogene* **7**(8): 1471-1480.
- Duncan AW, Rattis FM, DiMascio LN, Congdon KL, Pazianos G, Zhao C, Yoon K, Cook JM, Willert K, Gaiano N, Reya T (2005) Integration of Notch and Wnt signaling in hematopoietic stem cell maintenance. *Nat Immunol* **6**(3): 314-322
- Dunwoodie SL, Henrique D, Harrison SM, Beddington RS (1997) Mouse Dll3: a novel divergent Delta gene which may complement the function of other Delta homologues during early pattern formation in the mouse embryo. *Development* **124**(16): 3065-3076
- Dzierzak E, Medvinsky A (1995) Mouse embryonic hematopoiesis. *Trends Genet* **11**(9): 359-366
- Dzierzak E, Speck NA (2008) Of lineage and legacy: the development of mammalian hematopoietic stem cells. *Nat Immunol* **9**(2): 129-136
- Eilken HM, Nishikawa S, Schroeder T (2009) Continuous single-cell imaging of blood generation from haemogenic endothelium. *Nature* **457**(7231): 896-900
- Ellisen LW, Bird J, West DC, Soreng AL, Reynolds TC, Smith SD, Sklar J (1991) TAN-1, the human homolog of the Drosophila notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell* **66**(4): 649-661
- Fang TC, Yashiro-Ohtani Y, Del Bianco C, Knoblock DM, Blacklow SC, Pear WS (2007) Notch directly regulates Gata3 expression during T helper 2 cell differentiation. *Immunity* **27**(1): 100-110
- Fassler R, Meyer M (1995) Consequences of lack of beta 1 integrin gene expression in mice. *Genes Dev* **9**(15): 1896-1908



- Fehon RG, Kooh PJ, Rebay I, Regan CL, Xu T, Muskavitch MA, Artavanis-Tsakonas S (1990) Molecular interactions between the protein products of the neurogenic loci Notch and Delta, two EGF-homologous genes in *Drosophila*. *Cell* **61**(3): 523-534
- Ferkowicz MJ, Yoder MC (2005) Blood island formation: longstanding observations and modern interpretations. *Exp Hematol* **33**(9): 1041-1047
- Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML (1995) Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* **376**(6535): 66-70.
- Fre S, Huyghe M, Mourikis P, Robine S, Louvard D, Artavanis-Tsakonas S (2005) Notch signals control the fate of immature progenitor cells in the intestine. *Nature* **435**(7044): 964-968
- Frise E, Knoblich JA, Younger-Shepherd S, Jan LY, Jan YN (1996) The *Drosophila* Numb protein inhibits signaling of the Notch receptor during cell-cell interaction in sensory organ lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(21): 11925-11932
- Fujiwara Y, Browne CP, Cunniff K, Goff SC, Orkin SH (1996) Arrested development of embryonic red cell precursors in mouse embryos lacking transcription factor GATA-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(22): 12355-12358
- Garcia-Porrero JA, Godin IE, Dieterlen-Lievre F (1995) Potential intraembryonic hemogenic sites at pre-liver stages in the mouse. *Anat Embryol (Berl)* **192**(5): 425-435
- Gekas C, Dieterlen-Lievre F, Orkin SH, Mikkola HK (2005) The placenta is a niche for hematopoietic stem cells. *Dev Cell* **8**(3): 365-375
- Godin I, Dieterlen-Lievre F, Cumano A (1995) Emergence of multipotent hemopoietic cells in the yolk sac and paraaortic splanchnopleura in mouse embryos, beginning at 8.5 days postcoitus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(3): 773-777
- Godin IE, Garcia-Porrero JA, Coutinho A, Dieterlen-Lievre F, Marcos MA (1993) Para-aortic splanchnopleura from early mouse embryos contains B1a cell progenitors. *Nature* **364**(6432): 67-70
- Gothert JR, Gustin SE, Hall MA, Green AR, Gottgens B, Izon DJ, Begley CG (2005) In vivo fate-tracing studies using the *Scf* stem cell enhancer: embryonic hematopoietic stem cells significantly contribute to adult hematopoiesis. *Blood* **105**(7): 2724-2732
- Grabher C, von Boehmer H, Look AT (2006) Notch 1 activation in the molecular pathogenesis of T-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Rev Cancer* **6**(5): 347-359
- Grosveld F, Dillon N, Higgs D (1993) The regulation of human globin gene expression. *Baillieres Clin Haematol* **6**(1): 31-55
- Hadland BK, Huppert SS, Kanungo J, Xue Y, Jiang R, Gridley T, Conlon RA, Cheng AM, Kopan R, Longmore GD (2004) A requirement for Notch1 distinguishes 2 phases of definitive hematopoiesis during development. *Blood* **104**(10): 3097-3105
- Haines N, Irvine KD (2003) Glycosylation regulates Notch signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**(10): 786-797
- Haltiwanger RS (2002) Regulation of signal transduction pathways in development by glycosylation. *Curr Opin Struct Biol* **12**(5): 593-598
- Hamaguchi I, Morisada T, Azuma M, Murakami K, Kuramitsu M, Mizukami T, Ohbo K, Yamaguchi K, Oike Y, Dumont DJ, Suda T (2006) Loss of Tie2 receptor compromises embryonic stem cell-derived endothelial but not hematopoietic cell survival. *Blood* **107**(3): 1207-1213
- Hart A, Melet F, Grossfeld P, Chien K, Jones C, Tunnacliffe A, Favier R, Bernstein A (2000) Fli-1 is required for murine vascular and megakaryocytic development and is hemizygously deleted in patients with thrombocytopenia. *Immunity* **13**(2): 167-177
- Hayward P, Balayo T, Martinez Arias A (2006) Notch synergizes with axin to regulate the activity of armadillo in *Drosophila*. *Dev Dyn* **235**(10): 2656-2666

- Hayward P, Brennan K, Sanders P, Balayo T, DasGupta R, Perrimon N, Martinez Arias A (2005) Notch modulates Wnt signalling by associating with Armadillo/beta-catenin and regulating its transcriptional activity. *Development* **132**(8): 1819-1830
- Herranz H, Perez L, Martin FA, Milan M (2008) A Wingless and Notch double-repression mechanism regulates G1-S transition in the Drosophila wing. *EMBO J* **27**(11): 1633-1645
- His W. (1900) Lecithoblast und angioblast der wirbelthiere. *Abhandl KS Ges Wis Math-Phys* **22**: 171.
- Houssaint E (1981) Differentiation of the mouse hepatic primordium. II. Extrinsic origin of the haemopoietic cell line. *Cell Differ* **10**(5): 243-252
- Huber TL, Kouskoff V, Fehling HJ, Palis J, Keller G (2004) Haemangioblast commitment is initiated in the primitive streak of the mouse embryo. *Nature* **432**(7017): 625-630
- Ilagan MX, Kopan R (2007) SnapShot: notch signaling pathway. *Cell* **128**(6): 1246
- Inman KE, Downs KM (2007) The murine allantois: emerging paradigms in development of the mammalian umbilical cord and its relation to the fetus. *Genesis* **45**(5): 237-258
- Ishiko E, Matsumura I, Ezoe S, Gale K, Ishiko J, Satoh Y, Tanaka H, Shibayama H, Mizuki M, Era T, Enver T, Kanakura Y (2005) Notch signals inhibit the development of erythroid/megakaryocytic cells by suppressing GATA-1 activity through the induction of HES1. *J Biol Chem* **280**(6): 4929-4939
- Itoh M, Kim CH, Palardy G, Oda T, Jiang YJ, Maust D, Yeo SY, Lorick K, Wright GJ, Ariza-McNaughton L, Weissman AM, Lewis J, Chandrasekharappa SC, Chitnis AB (2003) Mind bomb is a ubiquitin ligase that is essential for efficient activation of Notch signaling by Delta. *Dev Cell* **4**(1): 67-82
- Iurlaro M, Scatena M, Zhu WH, Fogel E, Wieting SL, Nicosia RF (2003) Rat aorta-derived mural precursor cells express the Tie2 receptor and respond directly to stimulation by angiopoietins. *J Cell Sci* **116**(Pt 17): 3635-3643
- Jaffredo T, Bollerot K, Sugiyama D, Gautier R, Drevon C (2005a) Tracing the hemangioblast during embryogenesis: developmental relationships between endothelial and hematopoietic cells. *Int J Dev Biol* **49**(2-3): 269-277
- Jaffredo T, Gautier R, Eichmann A, Dieterlen-Lievre F (1998) Intraaortic hemopoietic cells are derived from endothelial cells during ontogeny. *Development* **125**(22): 4575-4583
- Jaffredo T, Nottingham W, Liddiard K, Bollerot K, Pouget C, de Bruijn M (2005b) From hemangioblast to hematopoietic stem cell: an endothelial connection? *Exp Hematol* **33**(9): 1029-1040
- Johnson GR, Moore MA (1975) Role of stem cell migration in initiation of mouse foetal liver haemopoiesis. *Nature* **258**(5537): 726-728
- Kabrun N, Buhning HJ, Choi K, Ullrich A, Risau W, Keller G (1997) Flk-1 expression defines a population of early embryonic hematopoietic precursors. *Development* **124**(10): 2039-2048
- Kao HY, Ordentlich P, Koyano-Nakagawa N, Tang Z, Downes M, Kintner CR, Evans RM, Kadesch T (1998) A histone deacetylase corepressor complex regulates the Notch signal transduction pathway. *Genes Dev* **12**(15): 2269-2277
- Karanu FN, Murdoch B, Miyabayashi T, Ohno M, Koremoto M, Gallacher L, Wu D, Itoh A, Sakano S, Bhatia M (2001) Human homologues of Delta-1 and Delta-4 function as mitogenic regulators of primitive human hematopoietic cells. *Blood* **97**(7): 1960-1967
- Kau CL, Turpen JB (1983) Dual contribution of embryonic ventral blood island and dorsal lateral plate mesoderm during ontogeny of hemopoietic cells in *Xenopus laevis*. *J Immunol* **131**(5): 2262-2266
- Kinder SJ, Tsang TE, Quinlan GA, Hadjantonakis AK, Nagy A, Tam PP (1999) The orderly allocation of mesodermal cells to the extraembryonic structures and the anteroposterior axis during gastrulation of the mouse embryo. *Development* **126**(21): 4691-4701
- Kisanuki YY, Hammer RE, Miyazaki J, Williams SC, Richardson JA, Yanagisawa M (2001) Tie2-Cre transgenic mice: a new model for endothelial cell-lineage analysis in vivo. *Dev Biol* **230**(2): 230-242.

- Kopan R, Goate A (2002) Aph-2/Nicastrin: an essential component of gamma-secretase and regulator of Notch signaling and Presenilin localization. *Neuron* **33**(3): 321-324
- Kumano K, Chiba S, Kunisato A, Sata M, Saito T, Nakagami-Yamaguchi E, Yamaguchi T, Masuda S, Shimizu K, Takahashi T, Ogawa S, Hamada Y, Hirai H (2003) Notch1 but not Notch2 is essential for generating hematopoietic stem cells from endothelial cells. *Immunity* **18**(5): 699-711
- Kumano K, Chiba S, Shimizu K, Yamagata T, Hosoya N, Saito T, Takahashi T, Hamada Y, Hirai H (2001) Notch1 inhibits differentiation of hematopoietic cells by sustaining GATA-2 expression. *Blood* **98**(12): 3283-3289
- Kuroda K, Han H, Tani S, Tanigaki K, Tun T, Furukawa T, Taniguchi Y, Kurooka H, Hamada Y, Toyokuni S, Honjo T (2003) Regulation of marginal zone B cell development by MINT, a suppressor of Notch/RBP-J signaling pathway. *Immunity* **18**(2): 301-312
- Kurooka H, Honjo T (2000) Functional interaction between the mouse notch1 intracellular region and histone acetyltransferases PCAF and GCN5. *J Biol Chem* **275**(22): 17211-17220
- Lai EC (2004) Notch signaling: control of cell communication and cell fate. *Development* **131**(5): 965-973
- Lai EC, Debrandre GA, Kintner C, Rubin GM (2001) Drosophila neuralized is a ubiquitin ligase that promotes the internalization and degradation of delta. *Dev Cell* **1**(6): 783-794
- Lam LT, Ronchini C, Norton J, Capobianco AJ, Bresnick EH (2000) Suppression of erythroid but not megakaryocytic differentiation of human K562 erythroleukemic cells by notch-1. *J Biol Chem* **275**(26): 19676-19684.
- Lancrin C, Sroczynska P, Stephenson C, Allen T, Kouskoff V, Lacaud G (2009) The haemangioblast generates haematopoietic cells through a haemogenic endothelium stage. *Nature* **457**(7231): 892-895
- Lardelli M, Dahlstrand J, Lendahl U (1994) The novel Notch homologue mouse Notch 3 lacks specific epidermal growth factor-repeats and is expressed in proliferating neuroepithelium. *Mech Dev* **46**(2): 123-136.
- Lawson KA, Meneses JJ, Pedersen RA (1991) Clonal analysis of epiblast fate during germ layer formation in the mouse embryo. *Development* **113**(3): 891-911
- Le Borgne R, Schweisguth F (2003) Notch signaling: endocytosis makes delta signal better. *Curr Biol* **13**(7): R273-275
- Lewis J (1998) Notch signalling and the control of cell fate choices in vertebrates. *Semin Cell Dev Biol* **9**(6): 583-589.
- Li DY, Sorensen LK, Brooke BS, Urness LD, Davis EC, Taylor DG, Boak BB, Wendel DP (1999) Defective angiogenesis in mice lacking endoglin. *Science* **284**(5419): 1534-1537
- Limbourg FP, Takeshita K, Radtke F, Bronson RT, Chin MT, Liao JK (2005) Essential role of endothelial Notch1 in angiogenesis. *Circulation* **111**(14): 1826-1832
- Lin CS, Lim SK, D'Agati V, Costantini F (1996) Differential effects of an erythropoietin receptor gene disruption on primitive and definitive erythropoiesis. *Genes Dev* **10**(2): 154-164
- Lindsell CE, Shawber CJ, Boulter J, Weinmaster G (1995) Jagged: a mammalian ligand that activates Notch1. *Cell* **80**(6): 909-917
- Logeat F, Bessia C, Brou C, LeBail O, Jarriault S, Seidah NG, Israel A (1998) The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(14): 8108-8112
- Maeno M, Tochizaki S, Katagiri C (1985) Differential participation of ventral and dorsolateral mesoderms in the hemopoiesis of *Xenopus*, as revealed in diploid-triploid or interspecific chimeras. *Dev Biol* **110**(2): 503-508
- Matsuno K, Diederich RJ, Go MJ, Blaumueller CM, Artavanis-Tsakonas S (1995) Deltex acts as a positive regulator of Notch signaling through interactions with the Notch ankyrin repeats. *Development* **121**(8): 2633-2644

- McKercher SR, Torbett BE, Anderson KL, Henkel GW, Vestal DJ, Baribault H, Klemsz M, Feeney AJ, Wu GE, Paige CJ, Maki RA (1996) Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities. *EMBO J* **15**(20): 5647-5658
- Medvinsky A, Dzierzak E (1996) Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell* **86**(6): 897-906
- Medvinsky AL, Samoylina NL, Muller AM, Dzierzak EA (1993) An early pre-liver intraembryonic source of CFU-S in the developing mouse. *Nature* **364**(6432): 64-67
- Migliaccio G, Migliaccio AR, Kreider BL, Rovera G, Adamson JW (1989) Selection of lineage-restricted cell lines immortalized at different stages of hematopoietic differentiation from the murine cell line 32D. *J Cell Biol* **109**(2): 833-841
- Miller AM (1913) Hemophoric Function of the Thoracic Duct in the Chick. *Science* **37**(962): 879-880
- Milner LA, Bigas A, Kopan R, Brashem-Stein C, Bernstein ID, Martin DI (1996) Inhibition of granulocytic differentiation by mNotch1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(23): 13014-13019
- Milner LA, Kopan R, Martin DI, Bernstein ID (1994) A human homologue of the Drosophila developmental gene, Notch, is expressed in CD34+ hematopoietic precursors. *Blood* **83**(8): 2057-2062
- Minegishi N, Suzuki N, Yokomizo T, Pan X, Fujimoto T, Takahashi S, Hara T, Miyajima A, Nishikawa S, Yamamoto M (2003) Expression and domain-specific function of GATA-2 during differentiation of the hematopoietic precursor cells in midgestation mouse embryos. *Blood* **102**(3): 896-905
- Minguet S, Cortegano I, Gonzalo P, Martinez-Marin JA, de Andres B, Salas C, Melero D, Gaspar ML, Marcos MA (2003) A population of c-Kit(low)(CD45/TER119)- hepatic cell progenitors of 11-day postcoitus mouse embryo liver reconstitutes cell-depleted liver organoids. *J Clin Invest* **112**(8): 1152-1163
- Moloney DJ, Panin VM, Johnston SH, Chen J, Shao L, Wilson R, Wang Y, Stanley P, Irvine KD, Haltiwanger RS, Vogt TF (2000) Fringe is a glycosyltransferase that modifies Notch. *Nature* **406**(6794): 369-375
- Moore MA, Metcalf D (1970) Ontogeny of the haemopoietic system: yolk sac origin of in vivo and in vitro colony forming cells in the developing mouse embryo. *Br J Haematol* **18**(3): 279-296
- Moore MA, Owen JJ (1965) Chromosome marker studies on the development of the haemopoietic system in the chick embryo. *Nature* **208**(5014): 956 passim
- Moore MA, Owen JJ (1967) Chromosome marker studies in the irradiated chick embryo. *Nature* **215**(5105): 1081-1082
- Morel V, Lecourtois M, Massiani O, Maier D, Preiss A, Schweisguth F (2001) Transcriptional repression by suppressor of hairless involves the binding of a hairless-dCtBP complex in Drosophila. *Curr Biol* **11**(10): 789-792
- Morgan TH (1917) The theory of the gene. *Am Nat* **51**: 513-544
- Morrison SJ, Hemmati HD, Wandycz AM, Weissman IL (1995) The purification and characterization of fetal liver hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(22): 10302-10306
- Mucenski ML, McLain K, Kier AB, Swerdlow SH, Schreiner CM, Miller TA, Pietryga DW, Scott WJ, Jr., Potter SS (1991) A functional c-myc gene is required for normal murine fetal hepatic hematopoiesis. *Cell* **65**(4): 677-689
- Mukhopadhyay M, Teufel A, Yamashita T, Agulnick AD, Chen L, Downs KM, Schindler A, Grinberg A, Huang SP, Dorward D, Westphal H (2003) Functional ablation of the mouse Ldb1 gene results in severe patterning defects during gastrulation. *Development* **130**(3): 495-505
- Muller AM, Medvinsky A, Strouboulis J, Grosveld F, Dzierzak E (1994) Development of hematopoietic stem cell activity in the mouse embryo. *Immunity* **1**(4): 291-301
- Mumm JS, Schroeter EH, Saxena MT, Griesemer A, Tian X, Pan DJ, Ray WJ, Kopan R (2000) A ligand-induced extracellular cleavage regulates gamma-secretase-like proteolytic activation of Notch1. *Mol Cell* **5**(2): 197-206

- Murray PDF. (1932) The development in vitro of blood of early chick embryo. *Proc R Soc London Biol Sci* **111**: 497–521.
- Murtaugh LC, Stanger BZ, Kwan KM, Melton DA (2003) Notch signaling controls multiple steps of pancreatic differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(25): 14920-14925
- Nakagawa M, Ichikawa M, Kumano K, Goyama S, Kawazu M, Asai T, Ogawa S, Kurokawa M, Chiba S (2006) AML1/Runx1 rescues Notch1-null mutation-induced deficiency of para-aortic splanchnopleural hematopoiesis. *Blood* **108**(10): 3329-3334
- Nostro MC, Cheng X, Keller GM, Gadue P (2008) Wnt, activin, and BMP signaling regulate distinct stages in the developmental pathway from embryonic stem cells to blood. *Cell Stem Cell* **2**(1): 60-71
- Nuez B, Michalovich D, Bygrave A, Ploemacher R, Grosveld F (1995) Defective haematopoiesis in fetal liver resulting from inactivation of the EKLF gene. *Nature* **375**(6529): 316-318
- Oikawa T, Yamada T, Kihara-Negishi F, Yamamoto H, Kondoh N, Hitomi Y, Hashimoto Y (1999) The role of Ets family transcription factor PU.1 in hematopoietic cell differentiation, proliferation and apoptosis. *Cell Death Differ* **6**(7): 599-608
- Oka C, Nakano T, Wakeham A, de la Pompa JL, Mori C, Sakai T, Okazaki S, Kawaichi M, Shiota K, Mak TW, Honjo T (1995) Disruption of the mouse RBP-J kappa gene results in early embryonic death. *Development* **121**(10): 3291-3301
- Okada H, Watanabe T, Niki M, Takano H, Chiba N, Yanai N, Tani K, Hibino H, Asano S, Mucenski ML, Ito Y, Noda T, Satake M (1998) AML1(-/-) embryos do not express certain hematopoiesis-related gene transcripts including those of the PU.1 gene. *Oncogene* **17**(18): 2287-2293
- Okajima T, Irvine KD (2002) Regulation of notch signaling by o-linked fucose. *Cell* **111**(6): 893-904
- Okajima T, Xu A, Irvine KD (2003) Modulation of notch-ligand binding by protein O-fucosyltransferase 1 and fringe. *J Biol Chem* **278**(43): 42340-42345
- Okuda T, van Deursen J, Hiebert SW, Grosveld G, Downing JR (1996) AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell* **84**(2): 321-330
- Orkin SH, Zon LI (2008) Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell* **132**(4): 631-644
- Oswald F, Kostezka U, Astrahantseff K, Bourteele S, Dillinger K, Zechner U, Ludwig L, Wilda M, Hameister H, Knochel W, Liptay S, Schmid RM (2002) SHARP is a novel component of the Notch/RBP-Jkappa signalling pathway. *EMBO J* **21**(20): 5417-5426
- Oswald F, Winkler M, Cao Y, Astrahantseff K, Bourteele S, Knochel W, Borggreffe T (2005) RBP-Jkappa/SHARP recruits CtIP/CtBP corepressors to silence Notch target genes. *Mol Cell Biol* **25**(23): 10379-10390
- Ottersbach K, Dzierzak E (2005) The murine placenta contains hematopoietic stem cells within the vascular labyrinth region. *Dev Cell* **8**(3): 377-387
- Palis J, Yoder MC (2001) Yolk-sac hematopoiesis: the first blood cells of mouse and man. *Exp Hematol* **29**(8): 927-936
- Palomero T, Lim WK, Odom DT, Sulis ML, Real PJ, Margolin A, Barnes KC, O'Neil J, Neuberg D, Weng AP, Aster JC, Sigaux F, Soulier J, Look AT, Young RA, Califano A, Ferrando AA (2006) NOTCH1 directly regulates c-MYC and activates a feed-forward-loop transcriptional network promoting leukemic cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(48): 18261-18266
- Pandolfi PP, Roth ME, Karis A, Leonard MW, Dzierzak E, Grosveld FG, Engel JD, Lindenbaum MH (1995) Targeted disruption of the GATA3 gene causes severe abnormalities in the nervous system and in fetal liver haematopoiesis. *Nat Genet* **11**(1): 40-44
- Panin VM, Papayannopoulos V, Wilson R, Irvine KD (1997) Fringe modulates Notch-ligand interactions. *Nature* **387**(6636): 908-912

- Parks AL, Klueg KM, Stout JR, Muskavitch MA (2000) Ligand endocytosis drives receptor dissociation and activation in the Notch pathway. *Development* **127**(7): 1373-1385
- Pavlopoulos E, Pitsouli C, Klueg KM, Muskavitch MA, Moschonas NK, Delidakis C (2001) neuralized Encodes a peripheral membrane protein involved in delta signaling and endocytosis. *Dev Cell* **1**(6): 807-816
- Pear WS, Aster JC, Scott ML, Hasserjian RP, Soffer B, Sklar J, Baltimore D (1996) Exclusive development of T cell neoplasms in mice transplanted with bone marrow expressing activated Notch alleles. *J Exp Med* **183**(5): 2283-2291
- Perkins AC, Sharpe AH, Orkin SH (1995) Lethal beta-thalassaemia in mice lacking the erythroid CACCC-transcription factor EKLF. *Nature* **375**(6529): 318-322
- Porcher C, Swat W, Rockwell K, Fujiwara Y, Alt FW, Orkin SH (1996) The T cell leukemia oncoprotein SCL/tal-1 is essential for development of all hematopoietic lineages. *Cell* **86**(1): 47-57
- Pui CH, Relling MV, Downing JR (2004) Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* **350**(15): 1535-1548
- Pui JC, Allman D, Xu L, DeRocco S, Karnell FG, Bakkour S, Lee JY, Kadesch T, Hardy RR, Aster JC, Pear WS (1999) Notch1 expression in early lymphopoiesis influences B versus T lineage determination. *Immunity* **11**(3): 299-308
- Puri MC, Bernstein A (2003) Requirement for the TIE family of receptor tyrosine kinases in adult but not fetal hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(22): 12753-12758
- Radtke F, Wilson A, Mancini SJ, MacDonald HR (2004) Notch regulation of lymphocyte development and function. *Nat Immunol* **5**(3): 247-253
- Radtke F, Wilson A, Stark G, Bauer M, van Meerwijk J, MacDonald HR, Aguet M (1999) Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1. *Immunity* **10**(5): 547-558
- Rebay I, Fleming RJ, Fehon RG, Cherbas L, Cherbas P, Artavanis-Tsakonas S (1991) Specific EGF repeats of Notch mediate interactions with Delta and Serrate: implications for Notch as a multifunctional receptor. *Cell* **67**(4): 687-699
- Rechsteiner M (1988) Regulation of enzyme levels by proteolysis: the role of pest regions. *Adv Enzyme Regul* **27**: 135-151
- Reya T, Duncan AW, Ailles L, Domen J, Scherer DC, Willert K, Hintz L, Nusse R, Weissman IL (2003) A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* **423**(6938): 409-414
- Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL (2001) Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* **414**(6859): 105-111
- Risau W (1991) Embryonic angiogenesis factors. *Pharmacol Ther* **51**(3): 371-376
- Robb L (1997) Hematopoiesis: origin pinned down at last? *Curr Biol* **7**(1): R10-12
- Robert-Moreno A, Espinosa L, de la Pompa JL, Bigas A (2005) RBPjkappa-dependent Notch function regulates Gata2 and is essential for the formation of intra-embryonic hematopoietic cells. *Development* **132**(5): 1117-1126
- Robert-Moreno A, Espinosa L, Sanchez MJ, de la Pompa JL, Bigas A (2007) The notch pathway positively regulates programmed cell death during erythroid differentiation. *Leukemia* **21**(7): 1496-1503
- Robert-Moreno A, Guiu J, Ruiz-Herguido C, Lopez ME, Ingles-Esteve J, Riera L, Tipping A, Enver T, Dzierzak E, Gridley T, Espinosa L, Bigas A (2008) Impaired embryonic haematopoiesis yet normal arterial development in the absence of the Notch ligand Jagged1. *Embo J* **27**(13): 1886-1895
- Russell ES (1979) Hereditary anemias of the mouse: a review for geneticists. *Adv Genet* **20**: 357-459
- Sabin FR. (1920) Studies on the origin of blood vessels and of red corpuscles as seen in the living blastoderm of chicks during the second day of incubation. *Contrib Embryol* **9**:213-262.

- Samokhvalov IM, Samokhvalova NI, Nishikawa S (2007) Cell tracing shows the contribution of the yolk sac to adult haematopoiesis. *Nature* **446**(7139): 1056-1061
- Sato TN, Tozawa Y, Deutsch U, Wolburg-Buchholz K, Fujiwara Y, Gendron-Maguire M, Gridley T, Wolburg H, Risau W, Qin Y (1995) Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature* **376**(6535): 70-74
- Schroeder T, Just U (2000) Notch signalling via RBP-J promotes myeloid differentiation. *EMBO J* **19**(11): 2558-2568
- Scott EW, Simon MC, Anastasi J, Singh H (1994) Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. *Science* **265**(5178): 1573-1577
- Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, Schuh AC (1995) Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* **376**(6535): 62-66.
- Sharma VM, Calvo JA, Draheim KM, Cunningham LA, Hermance N, Beverly L, Krishnamoorthy V, Bhasin M, Capobianco AJ, Kelliher MA (2006) Notch1 contributes to mouse T-cell leukemia by directly inducing the expression of c-myc. *Mol Cell Biol* **26**(21): 8022-8031
- Shawber C, Boulter J, Lindsell CE, Weinmaster G (1996) Jagged2: a serrate-like gene expressed during rat embryogenesis. *Dev Biol* **180**(1): 370-376
- Shivdasani RA, Mayer EL, Orkin SH (1995a) Absence of blood formation in mice lacking the T-cell leukaemia oncoprotein tal-1/SCL. *Nature* **373**(6513): 432-434
- Shivdasani RA, Rosenblatt MF, Zucker-Franklin D, Jackson CW, Hunt P, Saris CJ, Orkin SH (1995b) Transcription factor NF-E2 is required for platelet formation independent of the actions of thrombopoietin/MGDF in megakaryocyte development. *Cell* **81**(5): 695-704
- Shutter JR, Scully S, Fan W, Richards WG, Kitajewski J, DeBlandre GA, Kintner CR, Stark KL (2000a) Dll4, a novel Notch ligand expressed in arterial endothelium. *Genes Dev* **14**(11): 1313-1318.
- Shutter JR, Scully S, Fan W, Richards WG, Kitajewski J, DeBlandre GA, Kintner CR, Stark KL (2000b) Dll4, a novel Notch ligand expressed in arterial endothelium. *Genes Dev* **14**(11): 1313-1318
- Singh N, Phillips RA, Iscove NN, Egan SE (2000) Expression of notch receptors, notch ligands, and fringe genes in hematopoiesis. *Exp Hematol* **28**(5): 527-534.
- Socolovsky M, Nam H, Fleming MD, Haase VH, Brugnara C, Lodish HF (2001) Ineffective erythropoiesis in Stat5a(-/-)5b(-/-) mice due to decreased survival of early erythroblasts. *Blood* **98**(12): 3261-3273
- Spyropoulos DD, Pharr PN, Lavenburg KR, Jackers P, Papas TS, Ogawa M, Watson DK (2000) Hemorrhage, impaired hematopoiesis, and lethality in mouse embryos carrying a targeted disruption of the Fli1 transcription factor. *Mol Cell Biol* **20**(15): 5643-5652
- Swiatek PJ, Lindsell CE, del Amo FF, Weinmaster G, Gridley T (1994) Notch1 is essential for postimplantation development in mice. *Genes Dev* **8**(6): 707-719
- Takakura N, Huang XL, Naruse T, Hamaguchi I, Dumont DJ, Yancopoulos GD, Suda T (1998) Critical role of the TIE2 endothelial cell receptor in the development of definitive hematopoiesis. *Immunity* **9**(5): 677-686
- Tamura K, Taniguchi Y, Minoguchi S, Sakai T, Tun T, Furukawa T, Honjo T (1995) Physical interaction between a novel domain of the receptor Notch and the transcription factor RBP-J kappa/Su(H). *Curr Biol* **5**(12): 1416-1423
- Tan-Pertel HT, Walker L, Browning D, Miyamoto A, Weinmaster G, Gasson JC (2000) Notch signaling enhances survival and alters differentiation of 32D myeloblasts. *J Immunol* **165**(8): 4428-4436
- Tanigaki K, Honjo T (2007) Regulation of lymphocyte development by Notch signaling. *Nat Immunol* **8**(5): 451-456
- Tavian M, Coulombel L, Luton D, Clemente HS, Dieterlen-Lievre F, Peault B (1996) Aorta-associated CD34+ hematopoietic cells in the early human embryo. *Blood* **87**(1): 67-72

- Timmerman LA, Grego-Bessa J, Raya A, Bertran E, Perez-Pomares JM, Diez J, Aranda S, Palomo S, McCormick F, Izpisua-Belmonte JC, de la Pompa JL (2004) Notch promotes epithelial-mesenchymal transition during cardiac development and oncogenic transformation. *Genes Dev* **18**(1): 99-115
- Ting CN, Olson MC, Barton KP, Leiden JM (1996) Transcription factor GATA-3 is required for development of the T-cell lineage. *Nature* **384**(6608): 474-478
- Tsai FY, Keller G, Kuo FC, Weiss M, Chen J, Rosenblatt M, Alt FW, Orkin SH (1994) An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nature* **371**(6494): 221-226
- Tun T, Hamaguchi Y, Matsunami N, Furukawa T, Honjo T, Kawaichi M (1994) Recognition sequence of a highly conserved DNA binding protein RBP-J kappa. *Nucleic Acids Res* **22**(6): 965-971
- Turpen JB, Kelley CM, Mead PE, Zon LI (1997) Bipotential primitive-definitive hematopoietic progenitors in the vertebrate embryo. *Immunity* **7**(3): 325-334
- Turpen JB, Knudson CM, Hoefen PS (1981) The early ontogeny of hematopoietic cells studied by grafting cyto-genetically labeled tissue anlagen: localization of a prospective stem cell compartment. *Dev Biol* **85**(1): 99-112
- Ueno H, Weissman IL (2006) Clonal analysis of mouse development reveals a polyclonal origin for yolk sac blood islands. *Dev Cell* **11**(4): 519-533
- Uyttendaele H, Marazzi G, Wu G, Yan Q, Sassoon D, Kitajewski J (1996) Notch4/int-3, a mammary proto-oncogene, is an endothelial cell-specific mammalian Notch gene. *Development* **122**(7): 2251-2259.
- Venkatesh DA, Park KS, Harrington A, Miceli-Libby L, Yoon JK, Liaw L (2008) Cardiovascular and hematopoietic defects associated with Notch1 activation in embryonic Tie2-expressing populations. *Circ Res* **103**(4): 423-431
- Walker L, Carlson A, Tan-Pertel HT, Weinmaster G, Gasson J (2001) The notch receptor and its ligands are selectively expressed during hematopoietic development in the mouse. *Stem Cells* **19**(6): 543-552
- Wang Q, Stacy T, Binder M, Marin-Padilla M, Sharpe AH, Speck NA (1996) Disruption of the Cbfa2 gene causes necrosis and hemorrhaging in the central nervous system and blocks definitive hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(8): 3444-3449
- Wani MA, Means RT, Jr., Lingrel JB (1998) Loss of LKLF function results in embryonic lethality in mice. *Transgenic Res* **7**(4): 229-238
- Warren AJ, Colledge WH, Carlton MB, Evans MJ, Smith AJ, Rabbitts TH (1994) The oncogenic cysteine-rich LIM domain protein rbtn2 is essential for erythroid development. *Cell* **78**(1): 45-57
- Weinmaster G, Roberts VJ, Lemke G (1992) Notch2: a second mammalian Notch gene. *Development* **116**(4): 931-941
- Weiss MJ, Orkin SH (1995) Transcription factor GATA-1 permits survival and maturation of erythroid precursors by preventing apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(21): 9623-9627
- Weng AP, Ferrando AA, Lee W, Morris JPt, Silverman LB, Sanchez-Irizarry C, Blacklow SC, Look AT, Aster JC (2004) Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science* **306**(5694): 269-271
- Weng AP, Millholland JM, Yashiro-Ohtani Y, Arcangeli ML, Lau A, Wai C, Del Bianco C, Rodriguez CG, Sai H, Tobias J, Li Y, Wolfe MS, Shachaf C, Felsner D, Blacklow SC, Pear WS, Aster JC (2006) c-Myc is an important direct target of Notch1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Genes Dev* **20**(15): 2096-2109
- Wharton KA, Johansen KM, Xu T, Artavanis-Tsakonas S (1985) Nucleotide sequence from the neurogenic locus notch implies a gene product that shares homology with proteins containing EGF-like repeats. *Cell* **43**(3 Pt 2): 567-581
- Whyatt D, Lindeboom F, Karis A, Ferreira R, Milot E, Hendriks R, de Bruijn M, Langeveld A, Gribnau J, Grosveld F, Philipsen S (2000) An intrinsic but cell-nonautonomous defect in GATA-1-overexpressing mouse erythroid cells. *Nature* **406**(6795): 519-524



- Winnier G, Blessing M, Labosky PA, Hogan BL (1995) Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. *Genes Dev* **9**(17): 2105-2116
- Wu H, Liu X, Jaenisch R, Lodish HF (1995) Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor. *Cell* **83**(1): 59-67
- Wu L, Aster JC, Blacklow SC, Lake R, Artavanis-Tsakonas S, Griffin JD (2000) MAML1, a human homologue of *Drosophila* mastermind, is a transcriptional co-activator for NOTCH receptors. *Nat Genet* **26**(4): 484-489
- Yoder MC, Hiatt K, Dutt P, Mukherjee P, Bodine DM, Orlic D (1997a) Characterization of definitive lymphohematopoietic stem cells in the day 9 murine yolk sac. *Immunity* **7**(3): 335-344
- Yoder MC, Hiatt K, Mukherjee P (1997b) In vivo repopulating hematopoietic stem cells are present in the murine yolk sac at day 9.0 postcoitus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(13): 6776-6780
- Yoon MJ, Koo BK, Song R, Jeong HW, Shin J, Kim YW, Kong YY, Suh PG (2008) Mind bomb-1 is essential for intraembryonic hematopoiesis in the aortic endothelium and the subaortic patches. *Mol Cell Biol* **28**(15): 4794-4804
- Yun TJ, Bevan MJ (2003) Notch-regulated ankyrin-repeat protein inhibits Notch1 signaling: multiple Notch1 signaling pathways involved in T cell development. *J Immunol* **170**(12): 5834-5841